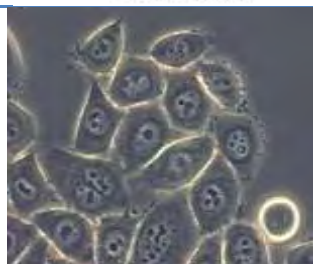
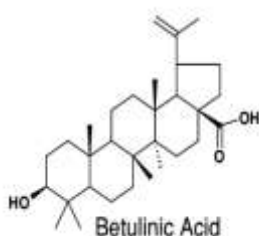
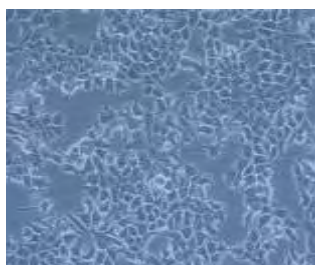




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική εργασία

**«Μελέτη της βιοχημικής δράσης του βετουλινικού οξέος (betulinic acid)  
στην ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7) και  
τραχήλου της μήτρας (HeLa)»**



**Φοιτήτρια:** Μοσχανδρέα Χρυσάνθη

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια:** Λιαδάκη Καλλιόπη

Λάρισα, 2014

**«Μελέτη της βιοχημικής δράσης του βετουλινικού οξέος (betulinic acid)  
στην ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7) και  
τραχήλου της μήτρας (HeLa)»**

**«Unravelling the biochemical action of betulinic acid, on the growth of  
human breast and cervical cancer cells»**

**Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

**Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και στο εργαστήριο των Κυτταροκαλλιεργειών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου καθηγήτριας Βιοχημικής Φαρμακολογίας κα. Λιαδάκης Καλλιόπη, το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος – Ιούλιος 2013. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε επιλέγοντας με για την διεξαγωγή της πτυχιακής εργασίας και έπειτα για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της. Η αμεσότητα στην προσπάθεια της να μεταλαμπαδεύσει τις γνώσεις της, το ήθος της διδασκαλίας της και ο σεβασμός απέναντι στους φοιτητές της, αποτέλεσε το κίνητρο για να απευθυνθώ σε αυτή για το σημαντικό αυτό κομμάτι των σπουδών μου. Η συνεργασία μας σε ερευνητικό επίπεδο ξεκίνησε τον Φεβρουάριου του 2013 και ήταν άψογη μέχρι και την ολοκλήρωση των πειραμάτων τον Ιούλιο του 2013. Εκτιμώ απεριόριστα την πολύτιμη βοήθεια της κατά την συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Εκτός από αξιόλογη καθηγήτρια, είναι και ένας σπουδαίος άνθρωπος και ήταν ιδιαίτερη χαρά μου να συνεργαστώ μαζί της.

Φυσικά, θα ήθελα να απευθύνω ειλικρινείς ευχαριστίες στην εξίσου σπουδαία καθηγήτρια μου, την κα. Ψαρρά Άννα – Μαρία για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την στήριξη της κατά την διάρκεια της εργασίας μου. Θεωρώ ότι είναι μια καθηγήτρια που εμπνέει τους φοιτητές της να μελετούν διαρκώς με σκοπό να διευρύνουν το γνωστικό τους πεδίο. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου που αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου και για την παραχώρηση χώρου στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος ώστε να διεξαχθεί μέρος των πειραμάτων μου.

Επίσης, οφείλω με χαρά μου να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς φοιτητές, Γοργογιέτα Βύρωνα, Γαλλιοπούλου Ελένη, Κροκιδά Αφροδίτη και Σαρρή Κωνσταντίνα για την συμβολή τους στο να εξοικειωθώ με το χώρο του εργαστηρίου και να συνυπάρχουμε ομαλά σε αυτόν.

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου την οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων, που με αγαπάει, στηρίζει κάθε βήμα μου και πιστεύει στις δυνατότητες μου.

Τελειώνοντας επιθυμώ να ευχαριστήσω τους πολυαγαπημένους μου φίλους Κωνσταντίνο, Μαριλένα, Αλέξανδρο, Χρίστο, Γιώργο, Κωνσταντίνα, Κάτια, Φρόσω, Μάγδα, Στάθη, Βαγγέλη, και Ιωάννα για την αγάπη, την υπομονή, την εμπιστοσύνη, το χιούμορ και την καθοδήγηση τους. Αισθάνομαι πολύ τυχερή που τους έχω στο πλευρό μου και περάσαμε μαζί τέσσερα υπέροχα και αξέχαστα φοιτητικά χρόνια.

Αφιερώνω την παρούσα διπλωματική στην οικογένεια μου, στην λατρεμένη μου θεία Χριστίνα και στην αγαπημένη μου γιαγιά Χρυσούλα.

Χρυσάνθη Μοσχανδρέα

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT	12
<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	13
<b>1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	14
<b>1.1 Γενικά</b>	14
<b>1.2 Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης</b>	16
<b>1.3 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων</b>	19
<b>1.4 Χημειοπροφύλαξη</b>	21
<b>2. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΦΥΤΩΝ</b>	25
<b>2.1 Γενικά</b>	25
<b>2.2 Τερπενοειδή – τερπένια (terpenoids)</b>	27
<b>2.2.1 Κατηγορίες τερπενίων</b>	27
<b>2.2.2 Βιοσύνθεση τερπενοειδών</b>	28
<b>2.2.3 Βετουλινικό Οξύ (Betulinic Acid)</b>	31
<b>2.2.3.1 Ανακάλυψη και πηγές απομόνωσης</b>	31
<b>2.2.3.2 Το φυτό Μπετούλα ή Βετούλα (Betulae) ή Βετούλη ή Σημύδα</b>	32
<b>2.2.3.3 Βιολογικές δράσεις βετουλινικού οξέος</b>	33
<b>2.2.3.4 Στόχοι και μηχανισμός δράσης βετουλινικού οξέος</b>	35
<b>2.2.3.5 Παράγωγα του βετουλινικού οξέος</b>	44
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	46
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	47

<b>1.Θρεπτικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια</b>	48
<b>2.Καρκινικές κυτταρικές σειρές</b>	51
<b>3.Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων</b>	53
<b>3.1</b> Συντήρηση των κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια	53
<b>3.2</b> Ανακαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων	54
<b>3.3</b> Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας	56
<b>3.4</b> Ψύξη - Πάγωμα κυττάρων	57
<b>3.5</b> Ξεπάγωμα κυττάρων	58
<b>3.6</b> Μέτρηση κυττάρων με την χρήση αιμοκυτταρόμετρου	58
<b>3.7</b> Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο XTT	61
<b>3.7.1</b> Αρχή της μεθόδου	61
<b>3.7.2</b> Πειραματική διαδικασία XTT	64
<b>3.8</b> Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	66
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	68
<b>1. Τιτλοδότηση κυττάρων (titration)</b>	67
<b>A)</b> Τιτλοδότηση κυττάρων HeLa (HeLa titration)	67
<b>B)</b> Τιτλοδότηση κυττάρων MCF-7 (MCF-7 titration)	69
<b>2. Επίδραση του betulinic acid (BA) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa &amp; MCF-7</b>	70
<b>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	78
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	80

## Περιεχόμενα εικόνων

<b>Εικόνα 1.1:</b> Υπόθεση των δύο γενετικών αλλαγών του Knudson.	16
<b>Εικόνα 1.2:</b> Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και σταδιακός σχηματισμός του όγκου.	18
<b>Εικόνα 1.3:</b> Χαρακτηριστικές ιδιότητες καρκινικών κυττάρων.	21
<b>Εικόνα 1.4:</b> Στάδια της καρκινογένεσης και η δυνατότητα παρέμβασης με την χρήση χημειοπροστατευτικών παραγόντων.	25
<b>Εικόνα 1.5:</b> Μονοπάτι βιοσύνθεσης ισοπρενοιδών.	30
<b>Εικόνα 1.6:</b> Χημική δομή βετουλινικού οξέος (betulinic acid) και βετουλίνης (betulin).	31
<b>Εικόνα 1.7:</b> Το φυτό Betula Alba (Birch common)	33
<b>Εικόνα 1.8:</b> Επαγωγή της απόπτωσης από συμβατικά αντικαρκινικά φάρμακα και από το βετουλινικό οξύ (BA).	38
<b>Εικόνα 1.9:</b> Καρκινική κυτταρική σειρά HeLa.	52
<b>Εικόνα 1.10:</b> Καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7.	53
<b>Εικόνα 1.11:</b> Η βασική διάταξη των αντικειμένων στην επιφάνεια εργασίας εντός του θαλάμου.	54
<b>Εικόνα 1.12:</b> Η δομή του πλακιδίου Neubauer.	59
<b>Εικόνα 1.13:</b> Σχήμα στην επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου όπου γίνεται η μέτρηση των κυττάρων.	60
<b>Εικόνα 1.14:</b> Τρόπος υπολογισμού των κυττάρων στο Neubauer.	61
<b>Εικόνα 1.15:</b> Αναγωγή του αντιδραστηρίου XTT στο έγχρωμο παράγωγο φορμαζάνης διαμέσω μιτοχονδριακών αφυδρογονασών και PMS.	62
<b>Εικόνα 1.16:</b> Χρωματομετρική αναγωγή του XTT από κυτταρικά ένζυμα.	63
<b>Εικόνα 1.17:</b> Τρυβλίο 96 βοθρίων ή 96-well plate που χρησιμοποιήθηκε στη διεξαγωγή των πειραμάτων.	65



## Περιεχόμενα γραφημάτων

<b><u>Γράφημα 1:</u></b> Πείραμα τιτλοδότησης για τα κύτταρα HeLa	69
<b><u>Γράφημα 2:</u></b> Πείραμα τιτλοδότησης για τα κύτταρα MCF-7	70
<b><u>Γράφημα 3:</u></b> Σύγκριση των ποσοστών αναστολής των κυττάρων HeLa και MCF-7 μετά από 72 και 96 ώρες επώαση τους με εκχύλισμα betulinic acid σε συγκέντρωση 200μM.	71
<b><u>Γράφημα 4:</u></b> Ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης που προκαλείται στα κύτταρα MCF-7, μετά από επώαση τους με διαφορετικά εκχυλίσματα του betulinic acid από Sigma και Phytolab σε συγκέντρωση 200μM	73
<b><u>Γράφημα 5:</u></b> Αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HeLa μετά από επώαση με BA αυξανόμενων συγκεντρώσεων και ετοποσίδη	74
<b><u>Γράφημα 6:</u></b> Αναστολή ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση με BA αυξανόμενων συγκεντρώσεων και ετοποσίδη	75

## **Περίληψη - Abstract**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπενοειδή αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη κατηγορία φυσικών ενώσεων με ποικίλες δράσεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η επαγωγή του θανάτου καρκινικών κυττάρων. Το βετουλινικό οξύ διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο μεταξύ αυτών των ενώσεων. Μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει ότι το βετουλινικό οξύ διαθέτει ισχυρή δράση έναντι πληθώρας καρκινικών κυτταρικών σειρών, χωρίς να επηρεάζει την ζωτικότητα των υγιών κυττάρων του οργανισμού. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα του βετουλινικού οξέος να αναστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa) και μαστού (MCF-7). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο χρόνος και η δραστηριότητα διαφορετικών συγκεντρώσεων του βετουλινικού οξέος, καθώς και η δραστηριότητα διαλυμάτων βετουλινικού οξέος που προμηθεύονται από διαφορετικές εταιρείες. Χρησιμοποιώντας τη βιοδοκιμή XTT, που βασίζεται στην δραστηριότητα μιτοχονδριακών ενζύμων, αποδείχτηκε ότι το βετουλινικό οξύ είναι ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε διαφορετικό βαθμό. Η διαπίστωση αυτή συμβαδίζει με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έχουν αναδείξει το βετουλινικό οξύ ως υποψήφιο χημειοπροφυλακτικό και αντικαρκινικό παράγοντα.

## ABSTRACT

Triterpenoids are one highly promising class of natural compounds which are able to induce tumor cell death. Betulinic acid (BetA) is one of the most prominent representative of these substances. *In vitro* studies have demonstrated that BetA is a potent compound against the growth of a variety of cancer cells, whereas its effect is relatively non-toxic for healthy cells. The present study is focused on the antiproliferative and cytotoxic effect of BetA on cervical (HeLa) and breast (MCF-7) human cancer cells. Specifically, the incubation time and a range of concentrations of BetA, as well as the effect of different compounds of BetA derived from two independent companies were examined. The XTT assay, which is based on mitochondrial enzymatic activity, was used to evaluate the inhibition of cellular growth. The results show that BetA can inhibit the proliferation of the tested cell lines, in agreement with previous studies, which suggest its potential use as supportive agent in the treatment of cancers with different tissue origin.

## **Α. Εισαγωγή**

# 1. Καρκίνος

## 1.1. Γενικά

Πολλές δεκαετίες έως και σήμερα,, γίνεται μια διαρκής προσπάθεια από ομάδες επιστημόνων να δώσουν ένα σαφή ορισμό στην έννοια της καρκινογένεσης. Ποικίλες θεωρίες έχουν επικρατήσει χωρίς όμως καμία από αυτές να είναι σε θέση να ερμηνεύσει την διαδικασία μετατροπής ενός υγιούς κυττάρου σε καρκινικό, λαμβάνοντας υπόψη όλους τους παραμέτρους που υπεισέρχονται. Συνεπώς, γίνεται φανερό ότι για να οδηγηθεί ένα κύτταρο στο να γίνει καρκινικό πρέπει να διέλθει μέσα από ένα αριθμό σταδίων και πολύπλοκων διαδικασιών. Η διαδικασία της καρκινογένεσης προϋποθέτει βλάβη στο γενετικό υλικό των κυττάρων για την οποία μπορούν να ενοχοποιηθούν χημικές ουσίες, ακτινοβολία, ογκογόνοι ιοί ή και ο συνδυασμός τους .

Τα *χημικά καρκινογόνα* προκαλούν μεταλλάξεις στα κύτταρα. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν ποικίλη χημική δομή και είναι φυσικές ή συνθετικές χημικές ενώσεις. Οι περισσότερες από αυτές ενεργοποιούνται μέσω μεταβολικής μετατροπής τους και άρα έχουν έμμεση δράση. Είναι τα λεγόμενα προκαρκινογόνα με τους ενεργούς μεταβολίτες τους να είναι τα τελικά καρκινογόνα. Όλες αυτές οι ενώσεις είναι ηλεκτρόφιλες και αντιδρούν με τα πλούσια σε ηλεκτρόνια μόρια του RNA, των κυτταρικών πρωτεϊνών και κυρίως του DNA. Πολλές φορές η καρκινογόνος δράση κάποιων από αυτά τα χημικά καρκινογόνα αυξάνεται όταν δρουν σε συνεργεία με τους προαγωγείς, δηλαδή με ουσίες που έχουν μικρή ή και καθόλου καρκινογόνο δράση. Εκτός από τα χημικά καρκινογόνα με έμμεση δράση, υπάρχουν και αυτά που έχουν άμεση ήπια δράση και είναι σημαντικά γιατί κάποια από αυτά όπως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου σήμερα.

Ο καρκίνος μπορεί να προκληθεί και από *ακτινοβολία* (υπεριώδης, ηλιακή, ακτίνες X, πυρηνική αντίδραση, ραδιοϊσότοπα) καθώς είναι σε θέση να προκαλέσει γενετικές βλάβες όπως ρήξη χρωμοσωμάτων, χρωμοσωμικές μεταθέσεις, και σημειακές μεταλλάξεις. Συνήθως η αθροιστική δράση των βλαβών που υφίσταται ένα κύτταρο το καθιστούν καρκινικό. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στο DNA σχηματίζοντας διμερή πυριμιδίνης και σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος.

Τέλος, έχει ανακαλυφθεί ότι στην ανάπτυξη καρκίνου συμμετέχουν *DNA* και *RNA* ιοί σε μικρό όμως βαθμό. Όσον αφορά το *RNA*, υπάρχουν οι άμεσα ογκογόννοι (acute transforming) ιοί, που μεταφέρουν ιικό ογκογονίδιο ικανό να μεταμορφώσει τα κύτταρα π.χ. src, abl, myb, καθώς και οι αργά μεταμορφωτικοί (slow transforming) ιοί που δεν μεταφέρουν ογκογονίδιο αλλά η δράση τους σχετίζεται με την ενσωμάτωση του ιικού (proviral) *DNA* κοντά σε ένα κυτταρικό πρωτοογκογονίδιο. Υπό την επίδραση ενός ισχυρού προαγωγέα του ιού, το γειτονικό φυσιολογικό (πρωτοογκογονίδιο) ή μεταλλαγμένο (ογκογονίδιο) υπερεκφράζεται. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μετάλλαξη από ενσωμάτωση ξένου *DNA* (insertional mutagenesis). Αντίθετα, οι *DNA* ιοί σχηματίζουν σταθερή σχέση με το γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή. Ο ενσωματωμένος ιός δεν μπορεί να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του, επειδή τα γονίδια του ιού που είναι σημαντικά για αυτόν, έχουν αλλοιωθεί κατά την ενσωμάτωση του ιικού *DNA*.

Το 1917, ο Alfred Knudson διατύπωσε το διάσημο μοντέλο των δύο χτυπημάτων στο καρκίνο (two hits hypothesis) κάνοντας σύγκριση επιδημιολογικών δεδομένων που αφορούσαν κληρονομήσιμες και σποραδικές μορφές του ρετινοβλαστώματος. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, υπάρχει μια αρχική μετάλλαξη ενός αλληλομόρφου γονιδίου στα γεννητικά κύτταρα οικογενειών με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο, η οποία κληρονομείται ενώ αργότερα μια δεύτερη μετάλλαξη του άλλου αλληλομόρφου συμβαίνει στα σωματικά κύτταρα οδηγώντας στην ανάπτυξη του καρκίνου (Barlow-Steward,2012) (**Εικ. 1.1**).





#### ■ Έναρξη της ογκογένεσης (*tumor initiation*)

Μεταλλάξεις μέσω ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα προκαλούνται σε ένα κύτταρο σχετικά αδιαφοροποίητο ή βλαστικό κύτταρο (stem cell). Οι μεταλλάξεις πιθανότατα αφορούν γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να οδηγηθεί σε τελική διαφοροποίηση. Έτσι δημιουργείται ένα κύτταρο που αυτοανανεώνεται συνεχώς ή εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι θα έκανε φυσιολογικά (self renewal)

#### ■ Προαγωγή της ογκογένεσης (*tumor promotion*)

Στο στάδιο αυτό επιλέγονται εκλεκτικά όσα κύτταρα διαθέτουν επιθετικότερο δυναμικό και δυνατότητα πολλαπλασιασμού στην αρχή, και ικανότητα μετανάστευσης αργότερα. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα φέρουν αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Δύο διαφορετικοί τύποι γεγονότων μπορούν να συμβάλλουν στην κακοήθη εξαλλαγή, η συσσώρευση σωματικών αλλαγών και η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας. Πρώιμες μεταλλάξεις συμβαίνουν σε γονίδια μεταλλάκτες (mutator genes), και τα απενεργοποιούν, με αποτέλεσμα ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης να αυξάνεται καθώς δεν επιδιορθώνονται οι βλάβες του DNA. Η γενετική αστάθεια συνδέεται με αλλαγές στον αριθμό των γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, λόγω διπλασιασμών ή ελλειμμάτων, ή και χρωμοσωμικών μετατοπίσεων μικρής ή μεγάλης έκτασης.

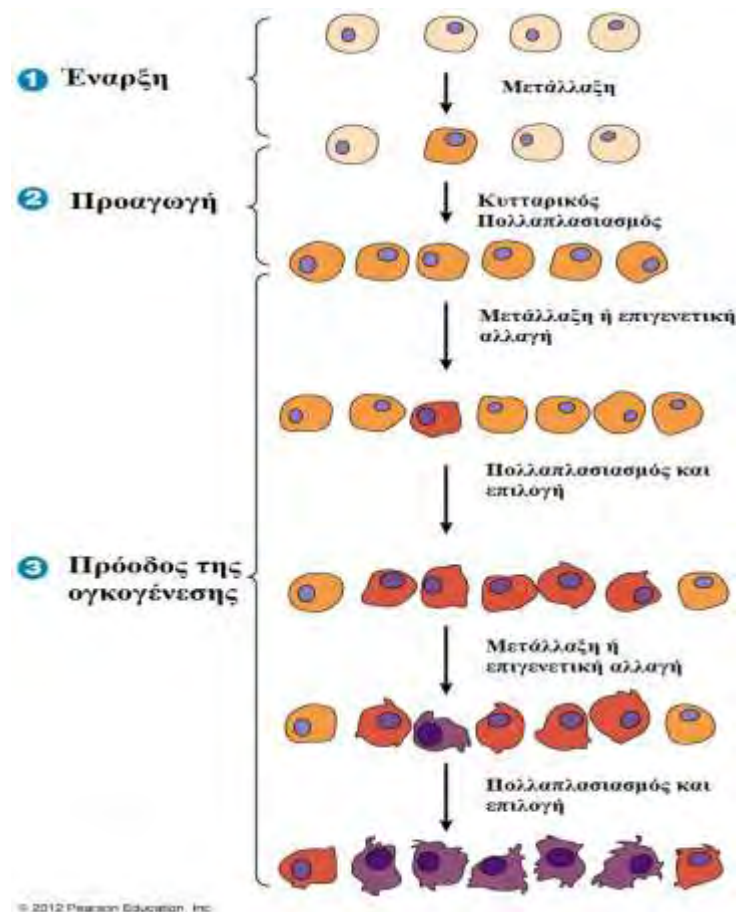
Τα αρχικά μεταλλαγμένα – μνημένα κύτταρα (initiated) πολλαπλασιάζονται κλωνικά μέσω μιτογόνων παραγόντων – προαγωγέων.

Αν ο μιτογόνος παράγοντας απομακρυνθεί, το στάδιο αυτό ανατρέπεται. Ενώ φυσιολογικά τα κύτταρα πεθαίνουν στην 40<sup>η</sup> διαίρεση, τα μνημένα κύτταρα προχωρούν στην 42<sup>η</sup> ή 43<sup>η</sup> διαίρεση, χωρίς να πεθαίνουν και απλά οι απόγονοι συσσωρεύουν γενωμικές βλάβες. Αυτές είναι ραγδαίες καθώς αυξάνεται και η γενωμική αστάθεια δραματικά μετά την 40<sup>η</sup> διαίρεση. Μια κρίσιμη μετάλλαξη προκύπτει σε κάποιο από αυτά και δημιουργεί το πρώτο προκαρκινικό κύτταρο. Τα γονίδια που έχουν άμεση επίδραση στην εμφάνιση του καρκίνου, είναι τα ογκογονίδια (oncogenes) που ενεργοποιούνται από μια μετάλλαξη, αλλά και τα γονίδια ογκοκαταστολείς (tumor suppressors) που η φυσιολογική λειτουργία τους παρεμποδίζει την ογκογένεση. Οι μεταλλάξεις που συσσωρεύονται σε ένα

σωματικό κύτταρο ενεργοποιούν τα ογκογονίδια και απενεργοποιούν τους ογκοκαταστολείς.

■ *Πρόοδος της ογκογένεσης (tumor progression)*

Στο στάδιο αυτό η κατάσταση είναι πλέον μη αναστρέψιμη. Το μεταλλαγμένο κύτταρο γίνεται καρκινικό ανεξάρτητα από τον προαγωγέα. Ο καρκινικός φαινότυπος εμφανίζεται αθροιστικά λόγω των επιπλέον γενετικών μεταλλαγών που προκαλεί η συνεχής μιτογόνο δράση του προαγωγέα. Έχει παρατηρηθεί ότι, στην ανάπτυξη των περισσότερων καρκίνων είναι απαραίτητες περισσότερες από δύο γενετικές βλάβες (**Εικ. 1.2**).



**Εικόνα 1.2:** Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και ο σταδιακός σχηματισμός του όγκου – (Αναπροσαρμογή από *Principles of Cell Biology* (Dr. Brian E. Staveley's Lectures)

### **1.3 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων**

Οι αλλαγές στη φυσιολογία των καρκινικών κυττάρων περιγράφονται στη συνέχεια.

#### ***1. Αυτάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες***

Για να μπορέσει ένα φυσιολογικό κύτταρο να πολλαπλασιαστεί, χρειάζεται εξωκυττάρια αυξητικά σήματα (growth signals) όπως διαλυτούς αυξητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες εξωκυττάριας ύλης ή μόρια αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων, τα οποία μεταφέρονται μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων ειδικών για κάθε σήμα. Χωρίς αυτά, το κύτταρο δεν είναι ικανό να προχωρήσει στη μίτωση. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν τους φυσιολογικούς αυξητικούς παράγοντες, τους απελευθερώνουν και αυτοί στην συνέχεια δεσμεύονται στους υποδοχείς τους και δίνουν το σήμα για περαιτέρω πολλαπλασιασμό.

#### ***2. Απεναισθητοποίηση των σημάτων που αναστέλλουν την ανάπτυξη***

Τα καρκινικά κύτταρα δεν αποκρίνονται σε σήματα που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη, όπως η είσοδος τους στη φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται ή σε μετά - μιτωτικές φάσεις. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες παρεμπόδισης της κυτταρικής διαίρεσης, οδηγούν τα κύτταρα να αγνοούν τα εξωκυττάρια μηνύματα καταστολής και να συνεχίζουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους.

#### ***3. Αποφυγή του προγραμματισμένου θανάτου (απόπτωσης)***

Τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στην απόπτωση καθότι έχουν χάσει τους προαποπτωτικούς ρυθμιστές, λόγω μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, το οποίο παράγει μια πρωτεΐνη που ενεργοποιεί είτε το μονοπάτι της απόπτωσης, είτε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όταν ανιχνεύσει βλάβες στο DNA.

#### **4. Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού**

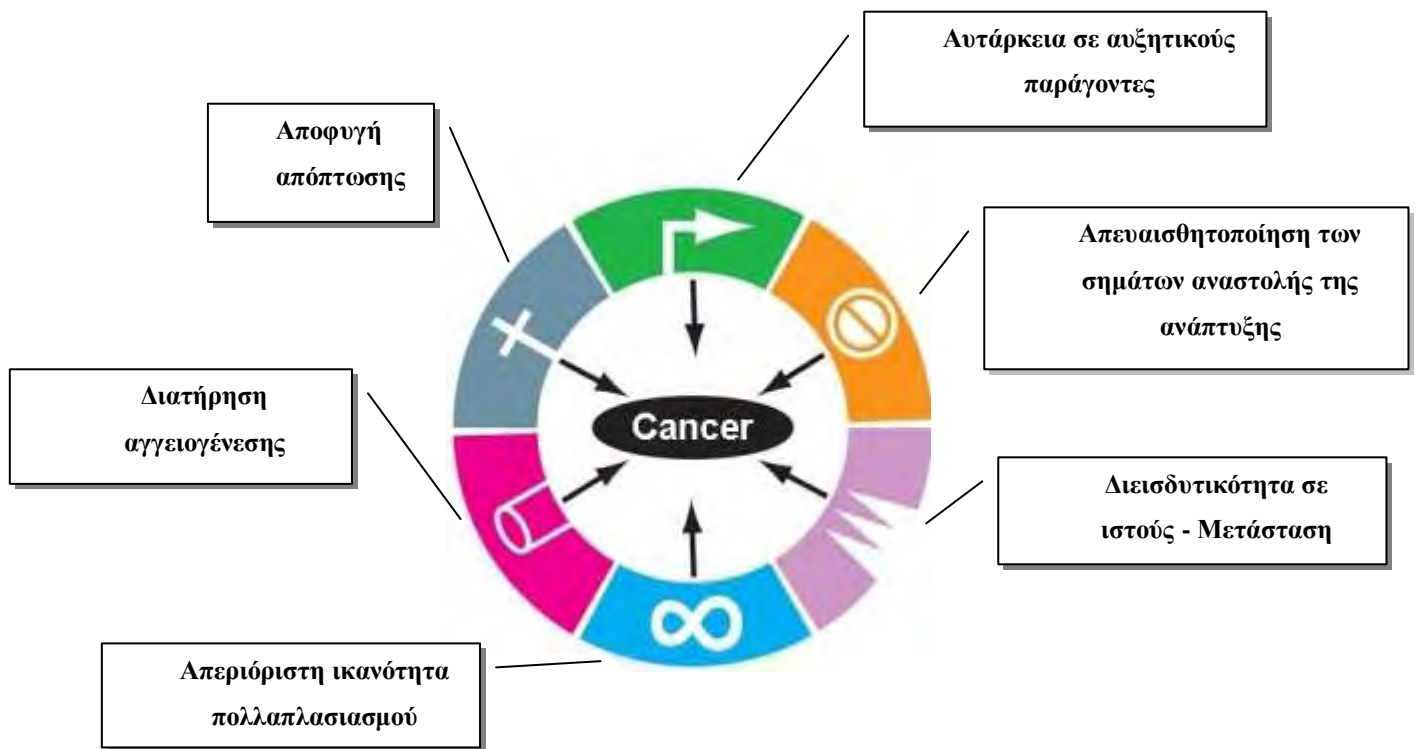
Τα φυσιολογικά κύτταρα των θηλαστικών μετά από 60-70 διαιρέσεις πεθαίνουν, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα που έχουν απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Το DNA προστατεύεται από μερικές χιλιάδες επαναλαμβανόμενα κομμάτια 6 ζευγαριών βάσεων που εντοπίζονται στο τέλος των χρωμοσωμάτων, και λέγονται τελομερή. Μετά από κάθε διπλασιασμό ο αριθμός των βάσεων αυτών μικραίνει έως ότου να εξαφανιστούν εντελώς, γεγονός που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού, γιατί διατηρούν το μήκος των τελομερών, είτε απορρυθμίζοντας την έκφραση του ενζύμου τελομεράση, (του ειδικού ενζύμου που προσθέτει επαναλαμβανόμενα εξανουκλεοτίδια στα άκρα του τελομερούς DNA), είτε με ανασχηματισμούς βάσεων στο εσωτερικό των χρωμοσωμάτων (σε μικρότερο ποσοστό, της τάξης του 10% - 15%). Τα τελομερή διατηρούν το μήκος τους και τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται απεριόριστα (αθανатоποίηση, immortalization).

#### **5. Διατήρηση της αγγειογένεσης**

Τα αγγεία παρέχουν στα κύτταρα οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Όταν ο ιστός σχηματίζεται, η διαδικασία της αγγειογένεσης, δηλαδή η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων, είναι εξαιρετικά ρυθμισμένη. Για να επεκταθούν τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αναπτύξουν την ικανότητα της αγγειογένεσης. Επιπλέον η καρκινική αγγειογένεση μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο του καρκινικού όγκου, τη θέση του, καθώς και με τα αγγειογενετικά και αντί-αγγειογενετικά μόρια που παράγουν τα ίδια τα κύτταρα του όγκου.

#### **6. Διεισδυτικότητα στους ιστούς (μεταστάσεις)**

Το κυριότερο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων και αυτό που οδηγεί στο θάνατο περίπου το 90% των περιπτώσεων καρκίνου, είναι η δυνατότητα διείσδυσης σε γειτονικούς ιστούς με την κυκλοφορία του αίματος και της λέμφου, και η δημιουργία νέων αποικιών ή μεταστατικών εστιών που δημιουργούν νέες αποικίες. Το φαινόμενο αυτό καλείται μετάσταση (metastasis) και είναι μια άκρως πολύπλοκη διεργασία (**Εικ. 1.3**).



**Εικόνα 1.3:** Χαρακτηριστικές ιδιότητες καρκινικών κυττάρων. Αναπροσαρμογή από το άρθρο Hanahan and Weinberg, *Cell*, 2000, 100:57-70

#### 1.4 Χημειοπροφύλαξη

Η πρώτη αναφορά στη χημειοπροφύλαξη έγινε το 460-377 π.χ. όπου ο πατέρας της ιατρικής Ιπποκράτης, αναφέρει: «*Η τροφή μπορεί να είναι φάρμακο για τον άνθρωπο και το φάρμακο μπορεί να αναζητηθεί στην τροφή*». Σαν έννοια πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1976 από τον Sporn. Ως «χημειοπροφύλαξη» ορίζεται η χρήση φυσικών ή συνθετικών χημικών παραγόντων με στόχο την αναστολή, την καταστολή ή ακόμα και την πρόληψη της διαδικασίας της καρκινογένεσης και της εξέλιξης προκαρκινικών βλαβών σε διηθητικό καρκίνωμα [Sporn MB, *Cancer Res* 36:2699-2702, 2000]. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται στην έκθεση σε χημικά καρκινογόνα όπως κάπνισμα, διατροφή και εργασιακό περιβάλλον [ACS. *Cancer Facts and Figures*, 1995. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1-3].

Η χημειοπροφύλαξη σήμερα αποτελεί ένα σημαντικό και πολλά υποσχόμενο κομμάτι της προσπάθειας πρόληψης και αποτελεσματικής θεραπείας του καρκίνου και για την χημειοπροφυλακτική προσέγγιση του καρκίνου έχουν προταθεί διάφορα διατροφικά αντιοξειδωτικά συστατικά και φυτοχημικά, όπως το λυκοπένιο, το σελήνιο, οι πολυφαινόλες στο πράσινο τσάι, το εκχύλισμα από σπόρο σταφυλιού, τα ω-3 λιπαρά οξέα, η γενιστεΐνη και η σίλιμπινίνη [Gescher AJ, et al, 2001].

Επειδή δεν είναι απόλυτα γνωστός ο μηχανισμός δράσης πολλών ενώσεων ή λόγω του γεγονότος ότι υπάρχουν παράγοντες που δρουν μέσω περισσότερων από έναν μηχανισμών, η κατηγοριοποίηση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων καθίσταται δύσκολη. Σύμφωνα με τον Wattenberg [Wattenberg (1985,) *Cancer Res*], υπάρχει η ακόλουθη ταξινόμηση που βασίζεται στη χρονική περίοδο στην οποία δρουν οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης:

### **1. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου (inhibitors of carcinogen formation)**

Αναστέλλουν συνήθως τον σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη, σε όξινο περιβάλλον και ως κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας τους είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) που ελαττώνει αυτό τον σχηματισμό όταν υπάρχει σε αρκετή ποσότητα, στο όξινο περιβάλλον του στομάχου [Hartman PE, Shankel DM:(1990) *Environ Mol Mutagen*]. Άλλες ουσίες με παρεμφερή δράση είναι οι φαινόλες, όπως το καφεϊκό και το γαλλικό οξύ καθώς και σουλφιδρυλικές ενώσεις. Τα αμινοξέα προλίνη και θειοπρολίνη δεσμεύουν τα νιτρώδη, αντιδρώντας με αυτά, σχηματίζοντας μη μεταλλαξιγόνες νιτροζαμίνες. Οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να ενσωματωθούν στη διατροφή ατόμων με αυξημένους ρυθμούς σχηματισμού ενδογενών νιτροζαμινών.

### **2. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (“blocking” agents)**

Οι παράγοντες αυτοί δρουν κατά την πρώτη φάση της καρκινογένεσης (initiation). Τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα που βρίσκονται στο περιβάλλον είναι μη δραστικά και ενεργοποιούνται καθώς μεταβολίζονται σε δραστικές ηλεκτρόφιλες μορφές. Οι μορφές αυτές αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικές ενώσεις, που οδηγούν σε λάθη κατά την αντιγραφή του DNA (μεταλλάξεις) και στην ενεργοποίηση πρωτοογκογονιδίων ή στην απενεργοποίηση αντιογκογονιδίων.

Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών διακρίνεται σε δύο φάσεις, τις αντιδράσεις της φάσης I και τις αντιδράσεις της φάσης II. Οι αντιδράσεις φάσης I αποτελούνται από αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης, με στόχο την μετατροπή ή την απομάκρυνση ενεργών ομάδων από το αρχικό μόριο της ξενοβιοτικής ουσίας. Οι αντιδράσεις της φάσης II περιλαμβάνουν αντιδράσεις σύζευξης με γλυκουρονικές ή θεικές ομάδες ή σύνδεση με γλουταθειόνη (GSH) ή με αμινοξέα και ακετυλίωση ή μεθυλίωση, με στόχο να αυξηθεί η υδροφιλικότητα των ξενοβιοτικών και να διευκολυνθεί η απέκκρισή τους.

Οι αντιδράσεις μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ενώσεων είναι πολύ σημαντικές, αφού προστατεύουν από την τοξικότητα διαφόρων ενώσεων, και καταλύονται από διαφορετικά ενζυμικά συστήματα. Συγκεκριμένα, το σύστημα του κυτοχρώματος P-450, το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που βρίσκονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων, συνιστά το πιο σημαντικό ενζυμικό σύστημα της φάσης I, και υπάρχουν παράγοντες που είτε αναστέλλουν, είτε ενισχύουν την ενεργότητά του. Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II είναι η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η τρανσφεράση του UDP γλυκουρονικού.

Συνεπώς, το ποσό του τελικού καρκινογόνου που είναι διαθέσιμο να αντιδράσει με το DNA εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ αντιδράσεων ενεργοποίησης (Φάση 1) και απενεργοποίησης (Φάση 2). Η ισορροπία αυτή αν και βρίσκεται κάτω από γενετικό έλεγχο, είναι δυνατόν να τροποποιηθεί από διάφορους παράγοντες, όπως τη διατροφή, την ηλικία, την ορμονική κατάσταση και την έκθεση σε φάρμακα ή άλλες ξενοβιοτικές ουσίες [Conney AH (1982), *Cancer Res*].

Συνοψίζοντας, στους παράγοντες που παρεμποδίζουν την δράση του καρκινογόνου περιλαμβάνονται αναστολείς ή επαγωγείς του κυτοχρώματος P-450, επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II, εξουδετερωτές των ηλεκτρόφιλων

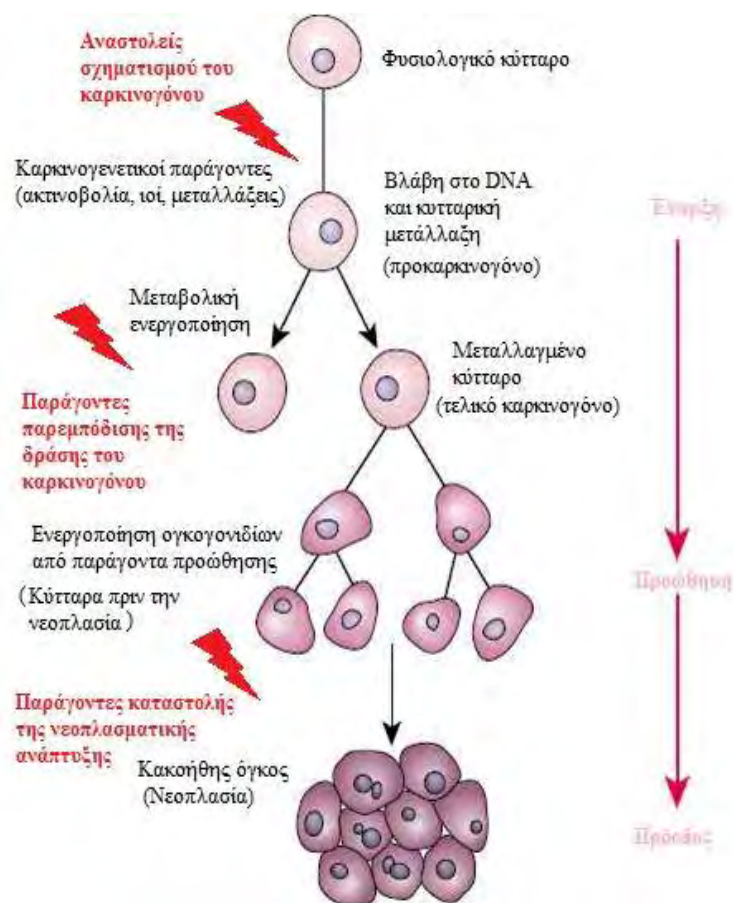
ουσιών και των ελευθέρων ριζών, δηλαδή ουσίες που δεσμεύουν και εξουδετερώνουν τις ενεργές μορφές των καρκινογόνων, όπως είναι η γλουταθειόνη, αλλά και οι επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης των βλαβών του DNA, όπως είναι η βανιλίνη, η οποία αναστέλλει την εμφάνιση μεταλλάξεων στα θηλαστικά [Packer JE, (1981) *Biochem Biophys Res Commun*].

### **3. Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης (“suppressing” agents)**

Οι παράγοντες αυτοί, αναστέλλουν την προαγωγική/προοδευτική φάση της καρκινογένεσης (promotion / progression). Η ταξινόμηση των παραγόντων που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι δύσκολη, γιατί τα κρίσιμα γεγονότα και η ακριβής αλληλουχία τους κατά την προαγωγική φάση και τη φάση της προόδου της καρκινογένεσης, δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως.

Παρόλα αυτά, οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις ταξινομούνται ως εξής: αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών, επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης (βιταμίνη Α), ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων όπως του TGF-β, ρυθμιστές της ‘οδού μετάδοσης του μηνύματος’(signal transduction), όπως η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, αναστολείς έκφρασης των ογκογονιδίων, επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας, ενισχυτές της ανοσολογικής απάντησης, επαγωγείς της απόπτωσης, επιδιορθωτές της ανισορροπίας της μεθυλίωσης του DNA, αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης, αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος ή αναστολείς της αγγειογένεσης [Morse MA, Stoner GC (1993)] (Εικ. 1.4).





**Εικόνα 1.4:** Στάδια της καρκινογένεσης και η δυνατότητα παρέμβασης με την χρήση χημειοπροστατευτικών παραγόντων. (Αναπροσαρμογή εικόνας από <http://www.hakeem sy.com>)

## 2. Δευτερογενείς Μεταβολίτες Φυτών

### 2.1. Γενικά

Για να επιτευχθεί η σύνθεση όλων των απαραίτητων συστατικών που συγκροτούν την θεμελιώδη δομή των κυττάρων των φυτών, όπως είναι η αναπνοή ή η σύνθεση πρωτεϊνών, είναι αναγκαία μεταβολική δραστηριότητα η οποία καλείται ως πρωτογενής μεταβολισμός. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στον πρωτογενή μεταβολισμό δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ κυττάρων, ιστών, ακόμα και οργανισμών. Προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού είναι οι ορμόνες (γιββερελίνες και

βρασσινοστεροειδή), οι φωτοσυνθετικές χρωστικές (καροτενοειδή), τα συστατικά μεμβρανών (στερόλες) και οι μεταφορείς ηλεκτρονίων (χλωροφύλλη) [Liu *et al*, 2005]. Τα βιομόρια που προέρχονται από την μεταβολική δραστηριότητα ενδιάμεσων ενώσεων του πρωτογενούς μεταβολισμού και παράγονται σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης, συνιστούν τον δευτερογενή μεταβολισμό [Καραμπουρνιώτης Γ, 2003].

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι χημικές ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος που ο συνολικός αριθμός τους υπερβαίνει κατά πολύ εκείνο των πρωτογενών μεταβολιτών. Η σύνθεση και η συσσώρευση τους αποτελεί μια συντονισμένη δραστηριότητα που συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης τους, δηλαδή με τον μηχανισμό δημιουργίας εξειδικευμένων κυττάρων, ενώ υπάρχουν μεταβολίτες που λειτουργούν αποκλειστικά σε ορισμένες μόνο οικογένειες φυτών. Στο παρελθόν, είχε επικρατήσει η αντίληψη ότι δευτερογενής μεταβολισμός συνιστά όλα τα παραπροϊόντα του πρωτογενούς. Αυτή καταρρίφτηκε με την επιβεβαίωση ότι η παραγωγή αυτών των μεταβολιτών συνδέεται στενά με την ύπαρξη και λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών απαραίτητων για την επιβίωση των φυτικών ειδών. Για την ακρίβεια, η απουσία τους δεν προκαλεί άμεσα θάνατο αλλά μια μακροπρόθεσμη βλάβη στη γονιμότητα ή στο φαινότυπο του οργανισμού.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην αύξηση και ανάπτυξη του φυτού (π.χ. φυτόλη χλωροφύλλης, καροτενοειδή, αμπζισικό οξύ, μεταφορείς σακχάρων κατά τη γλυκοσυλίωση πρωτεϊνών, φλαβονοειδή). Επιπρόσθετα, σημαντική είναι η δράση τους στην οικολογία του φυτού, όπως η προστασία του από βιοτικούς (παράσιτα, παθογόνα, ζώα) και αβιοτικούς παράγοντες (ηλιοφάνεια, θερμοκρασία) καθώς και η επικοινωνία μέσω χρωστικών ή πτητικών ενώσεων, στην εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων με βακτήρια ή με τον ανταγωνισμό με άλλα είδη [Καραμπουρνιώτης Γ., 2003; McGarvey and Croteau, 1995].

Οι τρεις μεγάλες ομάδες στις οποίες κατατάσσονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες με βάση την βιοσυνθετική οδό που ακολουθείται για την σύνθεση τους είναι:

- Οι *φαινολικές ουσίες*, που αποτελούνται από μεταβολίτες που διαθέτουν ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο στο μόριό τους, ο οποίος φέρνει ένα ή και

περισσότερα υδροξύλια και προέρχονται από τις βιοσυνθετικές οδούς του σικιμικού και του μηλονικού οξέος.

- Τα *τερπένια*, που συντίθενται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού με πρόδρομο μόριο το ακέτυλο-συνένζυμο Α ή μέσω της βιοσυνθετικής οδού του πυροσταφυλικού- φωσφογλυκεριναλδεΐδης.
- Οι *αζωτούχοι δευτερογενείς μεταβολίτες*, που περιλαμβάνουν ενώσεις οι οποίες προέρχονται από αμινοξέα, όπως τα αλκαλοειδή, οι μεταλαΐνες, διάφορα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, αμίνες όπως η ισταμίνη, κυανογενή γλυκοσΐδια, θειογλυκοζΐτες και αμυντικές πρωτεΐνες [Αγγελική Αϊναλίδου, 2008].

## 2.2 Τερπενοειδή – τερπένια (terpenoids)

### 2.2.1 Κατηγορίες τερπενίων

Ο όρος τερπενοειδή ή τερπένια προέρχεται από την γερμανική λέξη *terpentin* που σημαίνει εμπορικό νέφτι, διότι από αυτό το προϊόν απομονώθηκαν τα πρώτα μέλη της ομάδας. Τα τερπενοειδή έχουν ως βασικό σκελετό ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα, το ισοπεντενύλιο (IPP), που είναι η ενεργοποιημένη μορφή του ισοπρενίου, το οποίο προέρχεται από τη συμπύκνωση τριών μορίων ακέτυλο-CoA. Ο πολυμερισμός των μονάδων αυτών οδηγεί σε μακρομόρια που συνθέτουν σκελετούς με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων άνθρακα. Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων του ισοπρενίου δημιουργούνται και οι ομάδες των τερπενίων.

Τα μικρότερα τερπενοειδή ονομάζονται *ημιτερπενοειδή* γιατί περιέχουν μια μονάδα ισοπρενίου. Σε αυτήν την ομάδα ανήκει το ίδιο το ισοπρένιο, ένα πτητικό προϊόν που εκλύεται από φωτοσυνθετικά ενεργούς ιστούς. Τα τερπενοειδή με δέκα άτομα άνθρακα (*C10 terpenoids* -  $C_{10}H_{16}$ ) ονομάζονται *μονοτερπενοειδή* και είναι γνωστά ως συστατικά των πτητικών αποσταγμάτων των λουλουδιών, των βοτάνων και των μπαχαρικών. Τα τερπενοειδή με τρεις μονάδες ισοπρενίου, αποτελούνται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα και είναι γνωστά και ως *σεσκιτερπένια* (*C15 terpenoids* -  $C_{15}H_{24}$ ). Συναντώνται στα αιθέρια έλαια και ασκούν αντιμικροβιακή δράση στο σημείο προσβολής ή αποτρέπουν την προσβολή από έντομα όπως είναι οι φυτοαλεξίνες. Τα *διτερπενοειδή* αποτελούνται από είκοσι άνθρακες (*C20 terpenoids* -  $C_{20}H_{32}$ ) και περιλαμβάνουν

την φυτόλη, τα ρητινικά οξέα των ψυχανθών και των κωνοφόρων ειδών καθώς και τις γερανυλ-γερανιόλες, που απωθούν τα κουνούπια αλλά προσελκύουν τις μέλισσες για επικονίαση. Σε αυτά ανήκει η ταξόλη (Taxol), που αποτελεί αντικαρκινικό παράγοντα που απαντάται στον φλοιό του Ίταμου του Ειρηνικού (*Taxus brevifolia*), και η φορσκολίνη μία ένωση που παράγεται από το τροπικό *Coleus forskohlii*. Τα τριτερπενοειδή ( $C_{30}H_{48}$ ) περιέχουν 30 άτομα άνθρακα, αποτελούνται από 6 μονάδες ισοπρενίου και περιλαμβάνουν τα συστατικά μεμβράνης της φυτοστερόλης, ορισμένες φυτοαλεξίνες, ποικίλες τοξίνες και συστατικά της επιφάνειας των κεριών, όπως το ολεανολικό οξύ των σταφυλιών που χρησιμοποιείται για την θεραπεία του γλαυκώματος, στεροειδή (φυτοεκδυσόνες), τα λεμονοειδή (αιθέρια έλαια λεμονιάς), τα καρδιακά γλυκοζίδια (ολεανδρίνη) και τις σαπωνίνες (που παράγονται από τις πρόδρομες ενώσεις α-αμυρίνη, β-αμυρίνη, λουπεόλη). Τα τριτερπενοειδή διακρίνονται σε υποκατηγορίες που συμπεριλαμβάνουν τα σκουαλένια (squalenes) τις λανοστερόλες (lanostanes), τις δαμαράνες (dammaranes), τις λουπεόλες (lupanes), τις κυκλοαρτενόλες (cycloartanes) κ.α. Πολλά από αυτά ή ακόμη και τα συνθετικά παράγωγά τους έχουν μελετηθεί σαν ουσίες που έχουν ιατρική εφαρμογή καθώς δύναται να συμβάλουν στην καταπολέμηση πολλών ασθενειών, ακόμη και του καρκίνου επιδρώντας και τροποποιώντας κυρίως μεταγωγικά μονοπάτια. Τα τετρατερπενοειδή ( $C_{40}H_{64}$ ), βοηθούν την ανάπτυξη και την προστασία του φυτού, με σημαντικό μέλος τους τις καροτενοειδείς χρωστικές ουσίες που παρίστανται στο κέντρο αντίδρασης και στα σύμπλοκα κεραιών του φωτοσυστήματος, ενώ ταυτόχρονα απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου. Τέλος, τα πολυτερπενοειδή, είναι η ομάδα τερπενίων που διαθέτουν παραπάνω από 8 μονάδες ισοπρενίου και συμμετέχουν στις αντιδράσεις μεταφοράς των σακχάρων.

### 2.2.2 Βιοσύνθεση τερπενοειδών

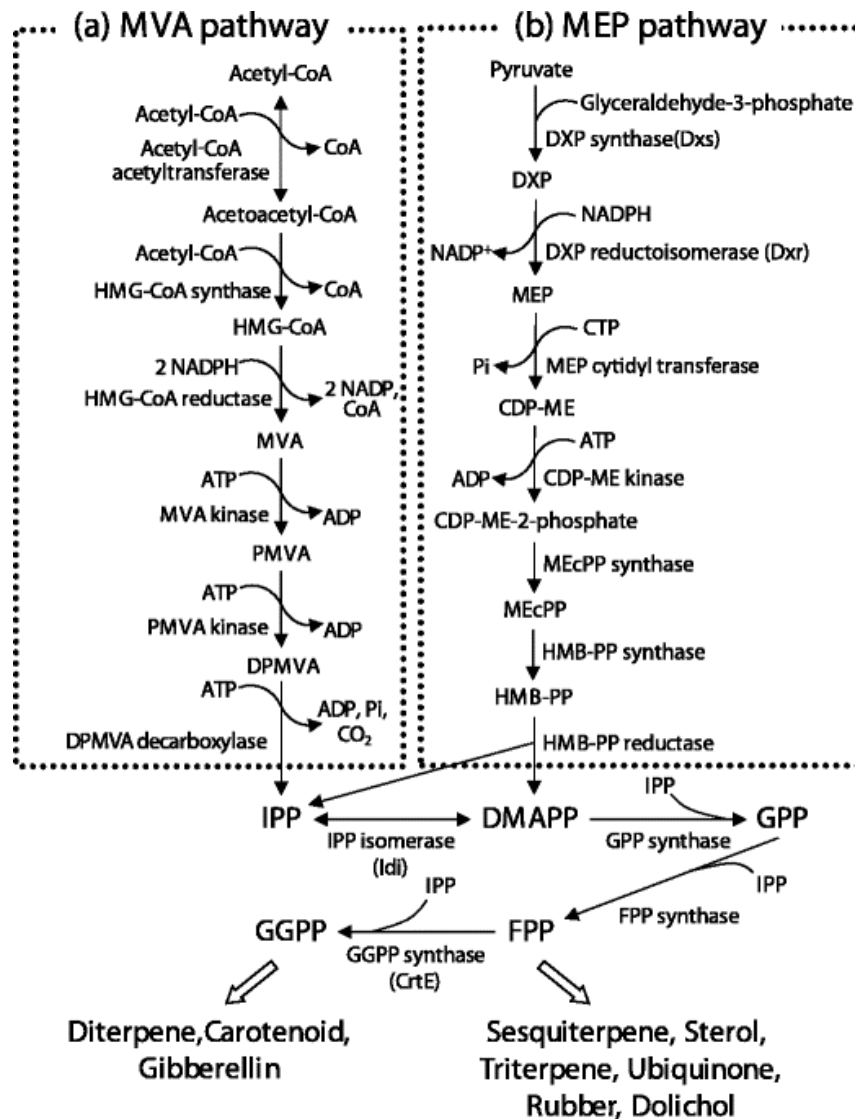
Η βιοσύνθεση των τερπενίων αρχίζει με το ακέτυλο-CoA, το μόριο εισόδου στον κύκλο του κιτρικού οξέος και προχωράει μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος. Σε αυτή τη διαδικασία, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, σε ένα μόριο ακέτυλο-CoA προστίθενται δύο μόρια ακέτυλο-CoA και αυτό μετατρέπεται σε 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA με τη δράση μιας

θειολάσης και μιας συνθάσης. Στη συνέχεια, ανάγεται σε μεβαλονικό οξύ στο κυτταρόπλασμα με 6 άτομα άνθρακα. Η ένωση αυτή φωσφορυλιώνεται δύο φορές από δύο κινάσες: την κινάση του μεβαλονικού οξέος και την κινάση του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος [Vranova et al, 2012; Philips et al, 2006]. Έπειτα, απομακρύνεται ένα μόριο CO<sub>2</sub> μέσω της αποκαρβοξυλάσης του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος με την κατανάλωση ενός μορίου ATP και έτσι προκύπτει το ισοπεντενύλιο (IPP).

Η ισομερής μορφή του IPP είναι το διφωσφορικό διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP). Τα δύο ισομερή συμπυκνώνονται και σε αυτά προστίθενται ένα ακόμα μόριο IPP που οδηγεί στο σχηματισμό του διφωσφορικού γερανύλιου (GPP). Με προσθήκη ενός ακόμα IPP σχηματίζεται το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP), το οποίο αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα και είναι η πρόδρομη ένωση των σεσκιτερπενίων. Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των πρενυλτρανσφερασών στο κυτταρόπλασμα.

Εκτός από την οδό του μεβαλονικού οξέος, τα φυτά εναλλακτικά βιοσυνθέτουν το ισοπρένιο μέσω του μονοπατιού της 4-φωσφορικής-2-μεθυλ-ερυθριτόλης (MEP) που λαμβάνει μέρος στους χλωροπλάστες [Eisenrich et al., 1998; Vranova et al., 2012]. Το πλαστιδιακό μονοπάτι θεωρείται υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των μονοτερπενίων, των διτερπενίων και των τετρατερπενίων, καθώς και της φυτόλης, των καροτενοειδών και της πλευρικής αλυσίδας της χλωροφύλλης. Η πρώτη αντίδραση αυτού του μονοπατιού είναι η σύμπτυξη του πυροσταφυλικού και της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, ένα ενδιάμεσο που προέρχεται από την γλυκόλυση και τον κύκλο του Calvin, προς παραγωγή 1-δεοξυ-5-φωσφο-ξυλουλόξης (DXP) [McGarvey and Croteau, 1995]. Στη συνέχεια, μέσω της ρεδουκτάσης DXP και με κατανάλωση ενός μορίου NADPH, παράγεται η 4-φωσφορική-2-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (CDP). Εν συνεχεία, μέσω μιας ρεδουκτάσης και δύο συνθασών, παράγεται το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (Εικ. 1.5).

Μεταξύ αυτών των δύο μονοπατιών που λειτουργούν παράλληλα, υπάρχει ανταλλαγή πρόδρομων χημικών μορίων, και κάποια τερπένια βιοσυντίθενται μέσω και των δυο μονοπατιών, ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού. Έχει παρατηρηθεί μεταφορά ισοπρενίων από το κυτταρόπλασμα στα πλαστίδια και αντίστροφα.



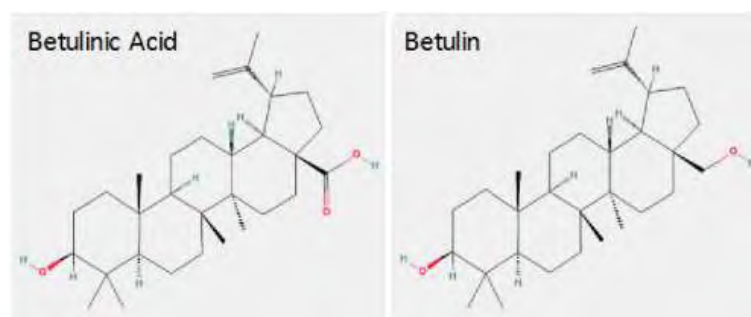
**Εικόνα 1.5:** Μονοπάτι βιοσύνθεσης ισοπρενοειδών. Τα ισοπρενοειδή συντίθενται μέσω δύο βιοσυνθετικών ανεξάρτητων μονοπατιών, του μεβαλονικού οξέος (MVA)(a) και της 4-φωσφορικής-2-μεθυλ-D-ερυθρίτης (MEP)(b)[Hisashi Harada, 2008].

## 2.2.3 Βετουλινικό Οξύ (Betulinic Acid)

### 2.2.3.1 Ανακάλυψη και πηγές απομόνωσης

Το βετουλινικό οξύ ή αλλιώς betulinic acid (BA) θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς εκπροσώπους της κατηγορίας των τριτερπενοειδών και μια πολλά υποσχόμενη φυσική ένωση με ποικίλες εφαρμογές. Πρόκειται για ένα πεντακυκλικό τριτερπενοειδές, όπως η  $\alpha$  ή  $\beta$  – αμυρίνη και η λουπεόλη.

Για πρώτη φορά απομονώθηκε το 1788 από τον Johann Tobias Lowitz ο οποίος ανακάλυψε ότι ήταν το κυριότερο συστατικό του εξωτερικού φλοιού δέντρων λεγόμενα και ως Μπέτουλα ή Λευκή Σημύδα ή *Betula alba* / *Betula pendula*. [Chen QH 2008, Eiznhamer DA 2004]. Το βετουλινικό οξύ αλλά και η βετουλίνη, ένα πρόδρομο μόριο του, είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στο φυτικό βασίλειο (Εικ. 1.6). Το πρώτο, εξάγεται από μια εξαιρετική ποικιλία φυτών ξεκινώντας από σαρκοβόρα όπως το *Sarracenia flava* (Sarraceniaceae) [Miles DH, 1974], και συνεχίζοντας με δέντρα και θάμνους, όπως *Diospyros spp* (Ebenaceae), *Inga punctata* (Fabaceae), [Kingston DG, 1978], *Ziziphus spp* (Rhamnaceae), *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae) και *Syzygium spp* (Myrtaceae) [Trumbull ER, 1976]. Η περιεκτικότητα σε βετουλίνη στο φλοιό της Λευκής Σημύδας είναι ιδιαίτερα υψηλή, σε ποσοστό που υπερβαίνει το 22%. Συνεπώς, η πιο αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης του βετουλινικού οξέος, είναι μέσω μιας απλής διαδικασίας οξείδωσης της βετουλίνης αφού απομονωθεί από το δέντρο [Cichewicz RH, Kouzi SA, 2004, Alakurti S, 2006]. Παρακάτω φαίνεται ο χημικός τύπος του βετουλινικού οξέος και της βετουλίνης (Εικ.1.6).



**Εικόνα 1.6:** Χημική δομή βετουλινικού οξέος (*betulinic acid*) και βετουλίνης (*betulin*),  
[Willmann M. et al, Eur J Clin Invest 2009]

### 2.2.3.2 Το φυτό Μπετούλα ή Βετούλα ή Βετούλη ή Σημύδα (Betulae)

Η Μπετούλα αποτελεί γένος φυλλοβόλων δέντρων και θάμνων, της οικογένειας των Σημυδοειδών (Betulaceae) και, απαντάται κυρίως σε Ρωσία, Σκανδιναβία και Βόρεια Ευρώπη. Το δέντρο αποτέλεσε στοιχείο λατρείας για πολλούς λαούς και ιδιαίτερα για τους Κέλτες, τους Σλάβους και τους Σκανδιναβούς, και συμβόλιζε τον ερχομό της άνοιξης. Στην Ελλάδα απαντάται αποκλειστικά στη Ροδόπη, στο Φαλακρό Όρος, και στο Παγγαίο, επειδή είναι ψυχρόφιλο δέντρο και είναι πιο συχνή η εμφάνιση του σε βόρεια και ορεινά μέρη (Εικ.1.7).

Η ετυμολογία του ονόματος του πηγάζει από την αντίστοιχη κέλτικη ονομασία του δέντρου «btu» και από το λατινικό ρήμα «batuere» που σημαίνει χτυπώ ή ραβδίζω, δεδομένου ότι τα κλαδιά του δέντρου χρησιμοποιούνταν στην αρχαιότητα ως μέσο διαπαιδαγώγησης των παιδιών στα σχολεία. Η ονομασία σημύδα αποδόθηκε στο δέντρο χάρη στο λευκό, ασημένιο χρώμα του κορμού του. Η σημύδα χρησιμοποιείται ως καλλωπιστικό δέντρο στις Βόρειες χώρες ενώ θεωρείται εθνικό σύμβολο της Ρωσίας. Ως κατάλοιπο πιθανότατα της ιεροτελεστίας για τον ερχομό της άνοιξης, στη Βόρεια Σουηδία χρησιμοποιούν τα κλαδιά του για να στολίσουν το «γαϊτανάκι του Μάη». Επιπλέον, χαρακτηριστικό είναι το μαστίγωμα με κλάδους σημύδας στα ρωσικά λουτρά, με σκοπό να ενισχυθεί η θεραπευτική και αποτοξινωτική τους αξία.

Ως φαρμακευτικό φυτό χρησιμοποιούνται κυρίως τα φύλλα του, τα μπουμπούκια και λιγότερο ο φλοιός του δέντρου. Από αυτό απομονώνονται δραστικές ουσίες όπως είναι τα φλαβονοειδή και οι σαπωνίνες. Εκτιμάται ιδιαίτερα για τις διουρητικές, αντισηπτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του, θεωρείται ιδανικό για περιπτώσεις ουρολοίμωξης, κυστίτιδας και άλλες παθήσεις του ουροποιητικού συστήματος καθώς και για οιδήματα ή και κατακράτηση υγρών. Ενισχύει την λειτουργία του ήπατος και της χολής επειδή είναι αντιοξειδωτικό και τονωτικό. Συμβάλει, στην αποβολή του ουρικού οξέος και την αποτοξίνωση του οργανισμού, ενώ το φυτό φημολογείται ότι είναι σημαντικός σύμμαχος για το αδυνάτισμα και την καταπολέμηση της κυτταρίτιδας λόγω των λιποδιαλυτικών και τονωτικών ιδιοτήτων για την λέμφο.

Η εξωτερική χρήση της σημύδας βρίσκει εφαρμογή στην επούλωση πληγών και στην ακμή ή στα εξανθήματα. Ακόμη, ενδείκνυται για τη θεραπεία



κονδυλωμάτων, του εκζέματος και για άλλες δερματικές παθήσεις. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στο τριχωτό της κεφαλής εναντίον της τριχόπτωσης και της πιτυρίδας ενώ το έλαιο που αποστάζεται από το φλοιό της σημύδας, εφαρμόζεται σε ερεθισμούς του δέρματος. Στο φυτό, ζει παρασιτικά ένα είδος μύκητα, λεγόμενος και ως *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) που μπορεί να συσσωρεύει υψηλά ποσοστά βετουλινικού οξέος και να εφαρμοστεί εναντίον διάφορων μορφών καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος.

Στην εικόνα 1.7 φαίνεται η χαρακτηριστική μορφή του φυτού *Betula Alba*.



**Εικόνα 1.7:** Το φυτό *Betula Alba* (Birch, common) από <http://www.botanical.com>

### 2.2.3.3 Βιολογικές δράσεις βετουλινικού οξέος

- Σε μολυσματικές ασθένειες

Το 1994, επιστήμονες στο Πανεπιστήμιο της Βόρειας Καρολίνας ανέφεραν ότι οι χημικές ουσίες που βρέθηκαν στο λευκό φλοιό της σημύδας, επιβράδυναν την ανάπτυξη του HIV [Fujioka T, Kashiwada Y, 1994]. Την ίδια περίοδο ανακαλύφθηκε ότι το BA είναι αποτελεσματικό εναντίον του HIV, καθώς μπορούσε να αναστείλει την αντιγραφή του, και ένα παράγωγο του οξέος βρέθηκε ότι παρουσιάζει ακόμη ισχυρότερη δραστικότητα ως παράγοντας έναντι του HIV - 1, αλλά δεν είναι δραστικό έναντι του HIV - 2 [Mayaux JF, Bousseau A, 1994]. Ένα από τα παράγωγα του βετουλινικού οξέος, το PA457, έχει πολύ σπουδαία δράση καθότι εμποδίζει την ωρίμανση του ιού HIV - 1 και την απελευθέρωση του από μολυσμένα κύτταρα [Li F, Goila-Gaur R, 2003]. Σε κλινικές δοκιμές της φάσης I/II, η χορήγηση μονής δόσης

του παραγώγου PA457 ήταν αποτελεσματική και δεν δημιούργησε μεταλλάξεις ανθεκτικότητας στον ιό. Οι μελέτες συνεχίστηκαν και απέδειξαν ότι αν συμβεί κάποια μετάλλαξη στην ιική πρωτεΐνη gag αυτό θα οδηγούσε σε ανθεκτικότητα του ιικού στελέχους ως προς το παράγωγο του βετουλινικού οξέος [Adamson CS, 2009, Zhou J, 2006].

Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι το βετουλινικό οξύ έχει και αντιβακτηριδιακή δράση. Τα αποτελέσματα όμως των ερευνών είναι αμφιλεγόμενα. Πιο συγκεκριμένα, το BA συγκρινόμενο με το ουρσολικό και το ολεανολικό οξύ εμφανίστηκε ανενεργό έναντι των Gram - θετικών βακτηριδίων [Fontanay S, 2008] και σε μοντέλο ποντικού που είχε μολυνθεί από ελονοσία, δεν μπορούσε να μειώσει την παρασιταίμια [Steele JC, 1999]. Εντούτοις, πρόσφατες *in vivo* μελέτες σε ποντίκια μολυσμένα με το *Plasmodium berghei* απέδειξαν ότι το BA διαθέτει δραστηριότητα έναντι της λοίμωξης από το πλασμώδιο, επιβεβαιώνοντας εν μέρει την αντιβακτηριδιακή του ικανότητα [de Sa MS, Costa JF, 2009].

- **Αντικαρκινικές ιδιότητες**

Η πρώτη αναφορά για την αντικαρκινική δράση του BA προέρχεται από μια έρευνα του Διεθνούς Ιδρύματος Καρκίνου (National Cancer Institute) το 1995. Συγκεκριμένα, μετά από έλεγχο 2500 φυτικών εκχυλισμάτων, αποδείχτηκε ότι το BA μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναντίον του μελανώματος. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι το BA παρουσιάζει σημαντική κυτταροτοξικότητα εναντίον κυτταρικών σειρών μελανώματος MEL - 1 από λεμφαδένες, MEL - 2 από πλευριτικό υγρό και MEL - 4 που προέρχεται από ένα πρωτεύον δερματικό όγκο με την τιμή του IC<sub>50</sub> να κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 4,8 μg/ml [Udeani GO, 1999 ].

Επιπλέον, το BA είναι δραστικό έναντι όγκων του εγκεφάλου, όπως κύτταρα γλοιώματος, μυελοβλαστώματος και γλοιοβλαστώματος, καθώς ακόμη και σε πρωτογενή μυελοβλαστώματα. Ενδεικτικά, το BA αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων νευροεξωδερμικών καρκινικών κυττάρων, με τιμή IC<sub>50</sub> 14-17 μg/ml [Fulda S, 1997, Schmidt ML, 2010]. Μια μελέτη το 2001, έδειξε ότι το BA προκαλεί αξιοσημείωτη αναστολή του πολλαπλασιασμού σε καρκίνο των ωοθηκών (IC<sub>50</sub>: 1,8 - 4,5 μg/ml), σε μη μικροκυτταρικό και μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (IC<sub>50</sub>: 1.5 - 4.2 μg/ml) αλλά και σε καρκίνο του τραχήλου (IC<sub>50</sub>: 1,8μg/ml) [Zuco V., 2002]. Επιπλέον, το BA φαίνεται ότι δρα προστατευτικά σε αιματολογικές

ανωμαλίες και πιο συγκεκριμένα είναι ικανό να επάγει απόπτωση σε κύτταρα ασθενών που έχουν προσβληθεί από οξεία λευχαιμία με την θεραπεία να είναι εξαρτώμενη από το φύλο, την ηλικία και τον τύπο της λευχαιμίας [Ehrhardt H, 2004]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η στοχευμένη δράση του BA παρατηρείται μόνο στα καρκινικά κύτταρα, ενώ παρουσιάζεται λιγότερο τοξικό στα φυσιολογικά, υγιή κύτταρα που μελετήθηκαν. Ενδεικτικά, κύτταρα μελανώματος αποδείχθηκε ότι είναι πιο ευαίσθητα στο BA συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά μελανοκύτταρα [Selzer E, 2000, Galgon T, 2005]. Επιπλέον, οι ινοβλάστες και λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών παρουσιάζονται ιδιαίτερα ανθεκτικά στην δράση του BA [Zuco V, 2002, Rzeski W, 2006].

#### **2.2.3.4 Στόχοι και μηχανισμός δράσης βετουλινικού οξέος**

Το βετουλινικό οξύ φαίνεται να έχει πολλαπλές τοξικές επιδράσεις στα καρκινικά κύτταρα παρόλο που οι άμεσοι μοριακοί στόχοι του και η ακριβής αποσαφήνιση των μονοπατιών που ακολουθούνται παραμένουν άγνωστοι. Εκτενέστερη προσπάθεια έχει καταβληθεί στη μελέτη του ρόλου του βετουλινικού οξέος στην επαγωγή της απόπτωσης. Φυσικά αυτό το εγχείρημα φαίνεται να είναι αρκετά προκλητικό, καθώς υπάρχουν πολυάριθμοι στόχοι του βετουλινικού οξέος συμπεριλαμβανομένων κινασών, αμινοπεπτιδάσης N, ακετυλοτρανσφεράσης του ακέτυλο – coA καθώς και τοποϊσομερασών I/II. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας NF – κB, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αλλά και το πρωτεόσωμα έχουν αναφερθεί ως στόχοι και θα υπάρξουν και πολλοί άλλοι μελλοντικά καθότι το βετουλινικό οξύ έχει ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών επιδράσεων. Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας του βετουλινικού οξέος οφείλει να αποκαλύψει πώς οι αλληλεπιδράσεις θα οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από αυτό. Στη συνέχεια περιγράφεται πιο αναλυτικά ο μηχανισμός δράσης του BA.

- **Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος – Απόπτωση**

Η απόπτωση είναι μια διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται από τη προγραμματισμένη νέκρωση κυττάρων που έχουν συσσωρεύσει βλάβες ή έχουν στρεσοαριστεί. Ο αποπτωτικός μηχανισμός μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: την κατηγορία των *αισθητήρων* και την κατηγορία των *δραστών – αποτελεσμάτων*.

Οι αισθητήρες βρίσκονται στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου και ρυθμίζουν τις συνθήκες του έξω- και ενδο-κυτταρικού χώρου, καθορίζοντας αν θα επιζήσει ή όχι το κύτταρο. Συγκεκριμένα, αντιλαμβάνονται κάποια βλάβη είτε στη σηματοδότηση από την δράση των ογκογονιδίων, είτε στο DNA.

Τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 έχουν είτε προαποπτωτική (Bax, Bak, Bid, Bim), είτε αντιαποπτωτική δράση (Bcl-XL, Bcl-W) και δρουν καθορίζοντας τη σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου από τα μιτοχόνδρια με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C.

Στη κατηγορία των δραστών - αποτελεσμάτων περιλαμβάνονται κάποιες πρωτεάσες που ονομάζονται κασπάσες. Από αυτές, η κασπάση 8 και η κασπάση 9 ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς για τον κυτταρικό θάνατο FAS και από το κυτόχρωμα C που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, αντίστοιχα. Οι πρώτες αυτές κασπάσες ενεργοποιούν στην συνέχεια άλλες που εκτελούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Δύο είναι τα διακριτά μονοπάτια της απόπτωσης:

### **(1) το εξωγενές ή μονοπάτι υποδοχέα θανάτου**

Ενεργοποιείται μέσω τη σύνδεσης ενός «προσδέτη θανάτου» δηλαδή των CD95/ APO-1/ Fas-ligand στον υποδοχέα θανάτου του CD95/ APO-1/ Fas που ανήκουν στην υπεροικογένεια του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF). Αυτό έχει ως συνέπεια την διάσπαση της κασπάσης 8 και 10 μέσω του μορίου προσαρμογέα FADD (τομέας Fas σχετιζόμενος με θάνατο) [Medema JP, 1997, Greil, 1998]

### **(2) το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι.**

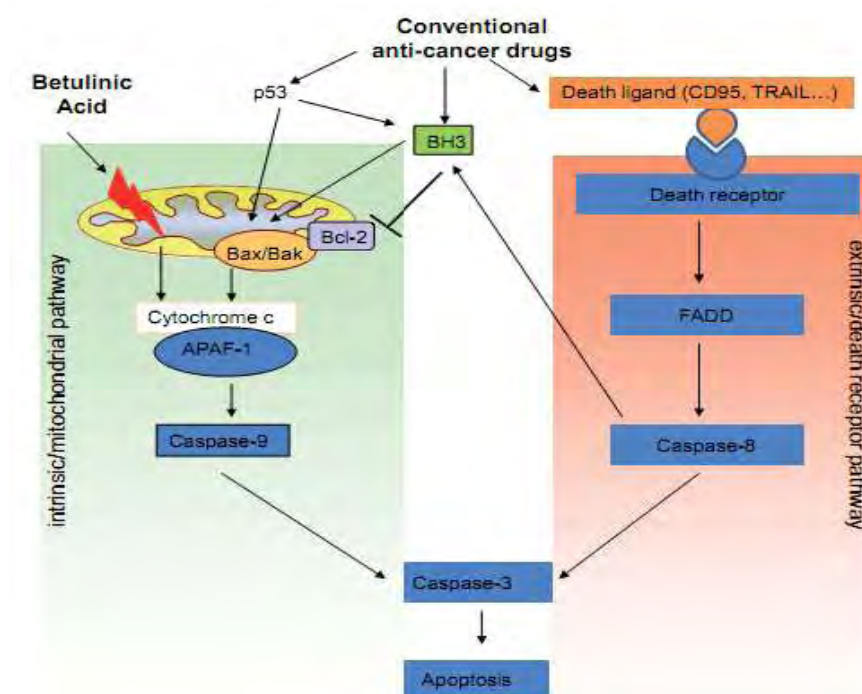
Το μιτοχονδριακό μονοπάτι ρυθμίζεται από την οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 που αποτελείται από μέλη προ-επιβίωσης (π.χ. Bcl-2, Bcl-XL ή Mcl-1) και προ-αποπτωτικά μέλη (Bax / Bak, BH3 - μονοπρωτεΐνες). Οι BH3 - μονοπρωτεΐνες ενεργοποιούνται από ποικίλα σήματα όπως κυτταρικό στρες, βλάβη του DNA, από ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου ή απομάκρυνση κυτοκίνης. Μόλις ενεργοποιηθούν, αυτά τα μόρια BH3 καθορίζουν την ισορροπία μεταξύ των προ-

αποπτωτικών (Bax και Bak) και αντι - αποπτωτικών (Bcl-2, ή BclXL Mcl- 1) μελών της Bcl-2 οικογένειας. Αυτό οδηγεί σε μιτοχονδριακή διαπερατότητα της μεμβράνης και στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος - c από τα μιτοχόνδρια. Η ενεργοποίηση της p53 οδηγεί στην έκφραση των μορίων Puma και Noxa ή στην άμεση ενεργοποίηση της Bax μεταγραφικά ή λειτουργικά [Villunger A, 2003, Chipuk JE, 2004].

Οι περισσότερες αντικαρκινικές θεραπείες αποτυγχάνουν επειδή τα καρκινικά κύτταρα γίνονται όλο και ανθεκτικότερα στις συμβατικές θεραπείες, αφού αναπτύσσουν μηχανισμούς διαφυγής από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που στοχεύουν την απόπτωση. Η απόπτωση γίνεται έμμεσα είτε μέσω του p53, είτε μέσω της σύνδεσης CD95L, TRAIL με τους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου τους, όπως η ταξόλη, η οποία χρησιμοποιείται σε χημειοθεραπείες καθώς μπορεί να δεσμεύεται σε πολυμερή μικροσωληνίσκων και να οδηγεί σε σχηματισμό μικροσωληνίσκων ανθεκτικών σε αποπολυμερισμό. Η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων έναντι στην ταξόλη δικαιολογείται είτε με μεταβολές στην τουμουλίνη, είτε με αλλαγές στο μονοπάτι της απόπτωσης [Orr GA, 2003]. Το μόριο Bim που είναι μια μονοπρωτεΐνη BH3, συνδέεται φυσιολογικά με την LC8 ελαφριά αλυσίδα της δυνεΐνης και απορροφάται από το σύμπλοκο των μικροσωληνίσκων. Η θεραπεία με ταξόλη, οδηγεί στην μετατόπιση της Bim και στην εξουδετέρωση της Bcl2, επάγωντας την απόπτωση [Puthalakath H, 1999]. Συνεπώς, η διαγραφή του Bim ή η υπερέκφραση της Bcl - 2 σε κύτταρα όγκου προκαλεί αντίσταση εναντίον της ταξόλης [Bouillet P, 1999].

Χαρακτηριστικές είναι επιπλέον θεραπείες που καταστρέφουν το DNA και προκαλούν συσσώρευση της πρωτεΐνης p53 που καταστέλλει τους όγκους. Ο p53 είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που συμβάλλει στην επιδιόρθωση του DNA, στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση με στόχους του στην αποπτωτική οδό τους Puma, Noxa, Bax, Bak, Bcl-XL και Bcl-2. Όμως, οι περισσότεροι από τους όγκους έχουν απενεργοποιήσει το μονοπάτι του p53, αυξάνοντας τους αναστολείς ή μειώνοντας τους ενεργοποιητές, με αποτέλεσμα πλέον να μην έχει αποτέλεσμα η θεραπεία μέσω ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονοπατιού [Fulda S, 2008, Fulda S, 2009]. Κατά συνέπεια, μια νέα θεραπεία αντικαρκινικών παραγόντων έρχεται στο προσκήνιο και περιλαμβάνει το βετουλινικό οξύ. Μέσω αυτής, στοχεύονται απευθείας τα μιτοχόνδρια και οι θεραπείες δεν είναι εξαρτώμενες του p53, πράγμα πολλά υποσχόμενο για την υπερνίκηση του καρκίνου.

Στο παρακάτω σχήμα συνοψίζονται όσα προαναφέρθηκαν για την επαγωγή της απόπτωσης από τα διάφορα σηματοδοτικά μόρια (**Εικ.1.8**).



**Εικόνα 1.8** Επαγωγή της απόπτωσης από συμβατικά αντικαρκινικά φάρμακα και από το βετουλινικό οξύ (BA): Ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα, είτε πυροδοτούν το μονοπάτι υποδοχέων θανάτου της απόπτωσης [προσδέτες θανάτου (CD95, TRAIL) → υποδοχέας θανάτου → Fas – συσχετιζόμενη πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου (FADD) → κασπάση 8 → κασπάση 3 → απόπτωση], είτε επάγουν το κυτταρικό στρες όπως η καταστροφή του DNA ή η ενεργοποίηση κυτοκινών οδηγώντας στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης μέσω της p53 και/ή των BH3 μονοπρωτεϊνών. Εν αντιθέσει, το βετουλινικό οξύ επάγει αμέσως μιτοχονδριακή καταστροφή οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ανεξάρτητα από τις Bax/Bak (οικογένεια Bcl-2 πρωτεϊνών).

- **Βετουλινικό οξύ και μιτοχόνδρια**

### **Ο ρόλος της p53**

Σε νευροεξωδερμικά καρκινικά κύτταρα η επαγωγή της απόπτωσης από το βετουλινικό οξύ ήταν ανεξάρτητη από την p53, σε αντίθεση με κύτταρα μελανώματος όπου στην απόπτωση εμπλεκόταν η p53. Επιπλέον, σε κύτταρα LN-229 and LN-18 δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της p53 ενώ σε κύτταρα μελανώματος ME20, δεν ανιχνεύθηκε καθόλου επαγωγή της Γενικά, αποδεικνύεται ότι το βετουλινικό οξύ επάγει το μονοπάτι της απόπτωσης χωρίς να παίζει κάποιο ρόλο η p53 [Selzer E, *J Invest Dermatol* 2000].

### **Ο ρόλος της οικογένειας Bcl-2 και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS)**

Σε κύτταρα νευροβλαστώματος SHEP, η υπερέκφραση της Bcl-2 και της Bcl-XL, εμποδίζει την απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, την υπερπαραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και την ενεργοποίηση των κασπασών. Η έκφραση των προαποπτωτικών μορίων Bax and Bcl-Xs επάγεται σε κύτταρα μετά από επώαση με το BA [Fulda S, *Cancer Res* 1997], ενώ το BA μπορεί να οδηγήσει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, αποδεικνύοντας έτσι την άμεση δράση που έχει σε αυτά. Μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από κύτταρα SHEP, τα οποία υπερέκφραζαν Bcl-2 ή Bcl-XL, ήταν ανθεκτικά στην επίδραση του BA [Fulda S, *Biol Chem* 1998]. Σε κύτταρα γλοιώματος, το BA επάγει την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, η οποία παρεμποδίζεται από την Bcl-2 ή από το αντιοξειδωτικό N-ακετυλ - κυστεΐνη (NAC). Η χορήγηση BA προκαλεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης της Bcl2 και Bax, ενώ τα επίπεδα της Bcl-Xs και της Bcl-XL δεν διαφοροποιούνται [Wick W, *J Pharmacol Exp Ther* 1999].

- **Άλλοι στόχοι του βετουλινικού οξέος**

### **Αμινοπεπτιδάση N (Aminopeptidase N, CD13)**

Η αμινοπεπτιδάση N (APN)/CD13 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεάση που υπάρχει σε μία ευρεία ποικιλία ανθρώπινων ιστών και τύπων κυττάρων

(ενδοθηλιακά, επιθηλιακά, ινοβλάστες, λευκοκύτταρα). Η έκφραση της απορυθμίζεται σε φλεγμονώδεις νόσους και σε καρκίνους. Μελέτες χρήσης φυσικών και συνθετικών αναστολέων της δραστηριότητας της APN, έχουν αποκαλύψει ότι η APN επηρεάζει σημαντικές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και άλλες βιολογικές εκδηλώσεις (κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση). Ως εκ τούτου, η αναστολή της APN/CD13 μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αντι-καρκινικών και αντι-φλεγμονώδων φαρμάκων. Επειδή η αμινοπεπτιδάση N αποτελεί ρυθμιστή της αγγειογένεσης και σχετίζεται με την καρκινογένεση, ερευνάται η λειτουργία του βετουλινικού οξέος σαν αναστολέας της αγγειογένεσης [Melzig MF, *Planta Med* 1998]. Υπάρχει μια μελέτη που προτείνει ότι οι επιδράσεις του βετουλινικού οξέος έναντι του μελανώματος οφείλονται στην αναστολή της δραστηριότητας της αμινοπεπτιδάσης N [Petrovic N, *Blood* 2007]. Ωστόσο, μια άλλη έρευνα, αναφέρει ότι η αντιαγγειογενετική δραστηριότητα του βετουλινικού οξέος αιτιολογείται από την δράση που ασκεί στα μιτοχόνδρια των ενδοθηλιακών κυττάρων [Kwon HJ, *Jpn J Cancer Res* 2002].

**Ακετυλοτρανσφεράση του ακετυλο-CoA (acetyl-CoA acyltransferase, ACAT), ακετυλοτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης (diacylglycerol acyltransferase, DGAT)**

Η ACAT υπάρχει στα θηλαστικά σε δύο ισομορφές και καταλύει την ακετυλίωση της χοληστερόλης προς χοληστερυλεστέρα. Ως εκ τούτου, οι αναστολείς της ACAT έχουν διερευνηθεί για τη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας και της αθηροσκλήρωσης. Το βετουλινικό οξύ αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της ανθρώπινης ACAT1 (μιτοχονδριακή ακετυλοτρανσφεράση του ακετυλ-CoA) και της ACAT2 (κυτοσολική ακετοακετυλ-CoA θειολάση) [Lee WS, *Biol Pharm Bull* 2006]. Επειδή η αντικαρκινική δράση του βετουλινικού οξέος συνδέεται στενά με τα μιτοχόνδρια, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί αν η αναστολή της ACAT σχετίζεται με αντικαρκινικές επιδράσεις επαγόμενες από το BA [Cases S, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998]. Η ακετυλοτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης (DGAT), είναι ένα μικροσωματικό ένζυμο που συνδέεται με την παχυσαρκία, και καταλύει το τελευταίο στάδιο στη σύνθεση της τριακυλογλυκερόλης, ενώ φαίνεται ότι παίζει



σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Αναστέλλεται από το βετουλινικό οξύ και έχει προταθεί σαν μια βασική ουσία για την θεραπεία της παχυσαρκίας [de Melo CL, *J Agric Food Chem* 2009]. Εξαιτίας του διαφορετικού μεταβολισμού μεταξύ των καρκινικών και των υγιών κυττάρων, είναι εφικτό ότι η αναστολή της DCAT που επάγεται από το βετουλινικό οξύ συνεισφέρει στα αντικαρκινικά του αποτελέσματα. Επιπλέον, ένα παράγωγο του βετουλινικού οξέος (NVX-207) συνδέεται στην απολιποπρωτεΐνη A-I που παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στη μεταφορά της χοληστερόλης [Chung MY, *Planta Med* 2006, , Willmann M, *Eur J Clin Invest* 2009].

### **Κινάσες**

Η χορήγηση του BA αποδείχθηκε ότι προκαλεί ενεργοποίηση της p38 αλλά και άλλων προαποπτωτικών MAP (ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεΐνες) κινασών, ενώ οι αντιαποπτωτικές MAP κινάσες παραμένουν ανεπηρέαστες. Μια μελέτη περιέγραψε τις ανταγωνιστικές επιδράσεις του U0126, ενός αναστολέα MEK (κινάση MAP) στην απόπτωση που επάγεται από το BA. Αναφέρθηκε επίσης ότι το BA ενεργοποιεί παροδικά το μονοπάτι επιβίωσης του EGFR/AKT, με αποτέλεσμα την μειωμένη ευαισθησία των κυττάρων μελανώματος ενώ παράλληλα υπάρχουν μελέτες που δεν ανιχνεύουν σημαντικές αλλαγές στην ERK 1/2 και στη δραστηριότητα της κινάσης AKT [Tan Y, *Clin Cancer Res* 2003, Rieber M, *Int J Cancer* 2006].

### **Τοποϊσομεράσες**

Η δράση των αντικαρκινικών ουσιών καμπτοθεκίνη και ετοποσίδη εξαρτάται από την αναστολή της τοποϊσομεράσης [Ferraro C, *Cell Death Differ* 2000].

Το βετουλινικό οξύ έχει βρεθεί ότι δρα ως καταλυτικός αναστολέας της δραστηριότητας των τοποϊσομερασών I και II. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου αναστέλλει την τοποϊσομεράση I ανακαλύφθηκε ότι είναι η πρόληψη της πρόσδεσης του ενζύμου στο DNA, το πρώτο από τα τρία στάδια που μεσολαβεί η τοποϊσομεράση, που είναι η σύνδεση, η θραύση του κλώνου και η επανασύνδεση [Wada S, *Chem Biodivers* 2005]. Σε μια διαφορετική μελέτη, η σίγηση της τοποϊσομεράσης I δεν επηρέασε το θάνατο των κυττάρων που προκαλείται από

το βετουλινικό οξύ, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αυτή η αναστολή δεν εμπλέκεται στη διαδικασία κυτταρικού θανάτου [Ganguly A, *Cancer Res* 2007]. Πρόσφατα, ημι- συνθετικά ανάλογα βετουλινικού οξέος ανακαλύφθηκαν να ασκούν ισχυρά ανασταλτικά αποτελέσματα μέσω τοποϊσομεράσης I και II και κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα, συγκρινόμενα με το βετουλινικό οξύ. Παρά το γεγονός ότι δεν έχει μελετηθεί εκτενώς ο κυτταρικός θάνατος εξαρτώμενος από τοποϊσομεράση είναι πιθανό το βετουλινικό οξύ να αποτελεί τη βάση για το σχεδιασμό νέων αναστολέων τοποϊσομεράσης [Bar FM, *J Nat Prod* 2009].

### **Παράγοντας NF-κΒ**

Ο κάπα πυρηνικός παράγοντας ελαφριάς αλυσίδας - ενισχυτής των ενεργοποιημένων Β κυττάρων (NF-κΒ), είναι μια σύνθετη πρωτεΐνη που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA. Βρίσκεται σε σχεδόν όλους τους τύπους ζωικών κυττάρων και εμπλέκεται σε κυτταρικές αποκρίσεις σε ερεθίσματα όπως το στρες, οι κυτοκίνες, οι ελεύθερες ρίζες, η υπερϊώδη ακτινοβολία, η οξειδωμένη LDL, και τα βακτηριακά ή ιικά αντιγόνα. Ο NF-κΒ παίζει ένα ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης στη μόλυνση (οι κάπα ελαφρές αλυσίδες είναι κρίσιμα συστατικά των ανοσοσφαιρινών). Εσφαλμένη ρύθμιση του NF-κΒ έχει συνδεθεί με τον καρκίνο, τις φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες, το σηψαιμικό σοκ, την ιική μόλυνση, και την λανθασμένη ανάπτυξη του ανοσοποιητικού. Ο NF-κΒ έχει επίσης εμπλακεί σε διαδικασίες συναπτικής πλαστικότητας και της μνήμης. [Levenson JM, *J. Neurosci.*, 2004, Meffert MK, *Nat. Neurosci.*, 2003].

Έχει ερευνηθεί ο ρόλος του NF - κΒ στον επαγόμενο από το BA κυτταρικό θάνατο και τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Μια έρευνα έδειξε ότι το BA αναστέλλει τον NF - κΒ. Η αναστολή εμπλέκει μειωμένη δραστηριότητα της IKK (IκΒ κινάσης) και κατασταλτική ενεργότητα NF - κΒ, η οποία επάγεται από διαφορετικά ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), ενισχύοντας έτσι την επαγόμενη από TNF απόπτωση. Επιπλέον, η καταστολή σημειώθηκε στους ρυθμιζόμενους από τον NF - κΒ παράγοντες ανάπτυξης, όπως η κυκλοοξυγενάσης 2 (COX - 2) και η μεταλλοπρωτεΐνωση υποστρώματος 9 (MMP - 9) [Takada Y, *J Immunol* 2003, Rabi T, *Mol Carcinog*

2008]. Εν αντιθέσει, μια άλλη έρευνα έδειξε την ενεργοποίηση του NF - κB από το BA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές οδηγώντας σε απόπτωση. Η επαγόμενη από BA απόπτωση μειώθηκε παρουσία χημικών αναστολέων του NF - κB [Kasperczyk H, *Oncogene* 2005]. Μία εξήγηση για αυτά τα φαινομενικά αντιφατικά αποτελέσματα θα μπορούσε να είναι η χρήση καρκινικών κυτταρικών γραμμών που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους όγκων. Οι μελέτες απέδειξαν την αναστολή στον NF- κB στον καρκίνο του προστάτη, ενώ την ενεργοποίησή του στην κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SHEP.

### **Κυτταρικός Κύκλος**

Η χορήγηση του BetA σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους όγκων οδήγησε σε μειωμένη έκφραση της κυκλίνης D1 (σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης) [Chinthalapalli S, *Cancer Res* 2007]. Το BetA διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό [Chen Z, *Univ Sci Technolog Med Sci* 2008]. Μια άλλη έρευνα, έδειξε συσσώρευση της p21 σε κύτταρα γλοιώματος μετά από έκθεση στο BetA, πράγμα που όμως δεν οδήγησε σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου [Wick W, *J Pharmacol Exp Ther* 1999]. Σε κύτταρα μελανώματος το BetA επάγει την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 και επιλεκτικά προκαλεί την μείωση της πρωτεΐνης Cdk4, αλλά δεν έχει καμία επίδραση σε άλλες πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, όπως τις cdc2, Cdk2, cdk7 και κυκλίνη A [Rieber M, *Int J Cancer* 2006].

### **Χρήση βετουλινικού οξέος σε συνδυαστικές θεραπείες κατά του καρκίνου**

Οι χημειοθεραπείες εφαρμόζονται συνήθως ως συνδυαστικές θεραπείες με πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις μεμονωμένες θεραπείες. Ο λόγος εφαρμογής συνδυαστικών θεραπειών έγκειται στο ότι ένα υψηλό ποσοστό των καρκινικών κυττάρων μπορεί να θανατώνονται με στόχευση διαφορετικών μονοπατιών ταυτόχρονα, αποφεύγοντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας ως προς μια συγκεκριμένη φαρμακευτική ουσία. Οι αντικαρκινικές επιδράσεις του BA έχουν μελετηθεί σε συνδυασμό με αρκετές άλλες θεραπείες για τον καρκίνο. Για παράδειγμα, η θεραπεία με BA σε συνδυασμό με ακτινοβολία προκάλεσε την αναστολή της ανάπτυξης των

κυττάρων του μελανώματος. λόγω της στόχευσης είτε διαφορετικών οδών ή διαφορετικών πληθυσμών κυττάρων όγκου [Selzer E, *J Invest Dermatol* 2000]. Επιπλέον, ο συνδυασμός του BA με τον αναστολέα του υποδοχέα του παράγοντα ανάπτυξης επιθηλιακών κυττάρων (EGFR), PO153035, βρέθηκε ότι ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων μελανώματος *in vitro* [Qiu L, *J Oncol* 2005]. Η συνχορήγηση του BA με τα αντικαρκινικά φάρμακα δοξορουβικίνη και ετοποσίδη επάγει την απόπτωση και αναστέλλει την επιβίωση σε κύτταρα νευροβλαστώματος SHEP [Fulda S, *Neoplasia* 2005]. Υπάρχουν όμως και μελέτες που δείχνουν ότι οι συνδυαστικές θεραπείες με το BA δεν οδηγούν σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η συνδυαστική θεραπεία BA και αναστολέων του NF – κB δεν είχε κανένα θεραπευτικό όφελος [Kasperczyk H, *Oncogene* 2005]. Συνεπώς, ο συνδυασμός του BA με άλλες θεραπείες πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά για κάθε θεραπεία και κάθε καρκινικό τύπο. Παρόλα αυτά, η χαμηλή κυτταροτοξικότητα του BA σε φυσιολογικά κύτταρα καθιστούν το BA ως μια πολλά υποσχόμενη ουσία που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυαστικές θεραπείες.

#### **2.2.3.5 Παράγωγα του βετουλινικού οξέος (betulinic acid derivatives)**

Η βετουλίνη είναι ένα προϊόν άφθονα διαθέσιμο από το φλοιό της λευκής σημύδας και έχει αναφερθεί ως το πρόδρομο μόριο του βετουλινικού οξέος. Αρχικά, περιγράφηκε ως ανενεργό ή λιγότερο ενεργό έναντι καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με άλλα τριτερπενοειδή [Kvasnica M, *Bioorg Med Chem* 2005]. Όμως, πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν την βετουλίνη ως αντικαρκινικό παράγοντα [Selzer E, *J Invest Dermatol* 2000, Pyo JS, *Planta Med* 2008].

Το βετουλινικό οξύ είναι ένας πολλά υποσχόμενος αντικαρκινικός παράγοντας, αλλά έχει ως σοβαρό μειονέκτημα την μικρή διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή του *in vivo*. Για το λόγο αυτό, αλλά και για την αναζήτηση ακόμη πιο ισχυρών αντικαρκινικών φαρμάκων, έχουν δοκιμαστεί ποικίλες εφαρμογές που επικεντρώνονται σε τροποποιήσεις του βετουλινικού οξέος σε πολλές θέσεις, όπως στις C-3, C-20 ή C-28 με σκοπό την ανάπτυξη παραγώγων του [Kim DS, *Bioorg Med Chem Lett* 1998]. Οι τροποποιήσεις στη θέση C-20 δεν ενίσχυσαν την κυτταροτοξικότητα σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές, αλλά τα παράγωγα του BetA στη θέση C-3 και C-28 φαίνονται να είναι ελπιδοφόρα [Kim JY, *Bioorg Med Chem Lett*

2001]. Αναλυτικά, η σύζευξη με αμινοξέα στην θέση C-28 ενισχύει τη διαλυτότητα στο νερό καθώς και την κυτταροτοξικότητα [Jeong HJ, *Bioorg Med Chem Lett* 1999]. Η υδροξυλίωση θέση C-3 είχε θετικά αποτελέσματα σε μυϊκά κύτταρα μελανώματος [Liu WK, *Eur J Pharmacol* 2004] ενώ μία άλλη χημική τροποποίηση στη θέση C-3 (dimethylsuccinyl BA) μετέτρεψε το BA από έναν ενεργοποιητή πρωτεοσώματος σε έναν αναστολέα πρωτεασώματος [Huang L, *FEBS Lett* 2007]. Ο σκελετός του δακτυλίου του βετουλινικού οξέος είναι η βάση για πολλές άλλες ενδιαφέροντες τροποποιήσεις [Liby K, *Mol Cancer Ther* 2007]. Ένα νέο παράγωγο του βετουλινικού οξέος, το NVX – 207, έδειξε σημαντική δραστηριότητα έναντι όγκου ασθενών.

## **ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της δράσης του βετουλινικού οξέος ως ενός πιθανού χημειοπροφυλακτικού, αντικαρκινικού παράγοντα. Ειδικότερα, η έρευνα επικεντρώθηκε στη χορήγηση διαλυμάτων βετουλινικού οξέος σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου (HeLa) και καρκίνου του μαστού (MCF-7) και εκτιμήθηκε η αναστολή στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους.

## **Β. Υλικά - Μέθοδοι**

## 1. Θρεπτικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

### **DMEM** (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1X, 500 mL*)

Παρασκευάζονται από την εταιρία Gibco με αριθμό καταλόγου 41966-052. Χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις καλλιέργειες κυττάρων και έχει την ακόλουθη σύσταση:

- ✓ 4,5 g/L D – γλυκόζη
- ✓ 4 mM L – γλουταμίνη
- ✓ 110 mg/L πυροσταφυλικό οξύ

### **PBS** (*Phosphate Buffered Saline, 1X, 500 mL*)

Παρασκευάζεται από την εταιρία Gibco με αριθμό καταλόγου 20012-019. Είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με την ακόλουθη σύσταση:

- ✓ 137 mmol/L NaCl
- ✓ 2,7 mmol/L KCl
- ✓ 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ✓ 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Το διάλυμα έχει pH:7,4 και δεν περιέχει MgCl<sub>2</sub> και CaCl<sub>2</sub>. Πρόκειται για ένα ισοτονικό διάλυμα που διατηρεί τη ζωτικότητα των κυττάρων της καλλιέργειας, κρατώντας το pH και την οσμωμοριακότητα σε φυσιολογικά επίπεδα. Χρησιμοποιείται για την έκπλυση της φλάσκας καλλιέργειας για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού πριν από την επώαση με την τρυψίνη, καθώς η παρουσία του ορού λειτουργεί ανασταλτικά στην δράση της τρυψίνης

### **Διάλυμα τρυψίνης 5 % (10X) σε EDTA (0,5 % trypsin- EDTA, no phenol red)**

Το διάλυμα περιέχει 5000 mg/L τρυψίνη, 2000 mg/L sodium EDTA (Na<sub>2</sub> – EDTA) και 8500 mg/L χλωριούχο νάτριο (NaCl). Η τρυψίνη προμηθεύεται από την



εταιρεία Gibco (αριθμός καταλόγου 15400-054) ως συγκεντρωμένο διάλυμα 10X και αραιώνεται σε διάλυμα PBS σε τελική συγκέντρωση 1X. Στη συνέχεια, δημιουργούνται aliquots τα οποία και διατηρούνται στους -20° C.

Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που συμβάλει στην απώλεια των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ κυττάρων και υποστρώματος. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προκαλούνται από διάφορες πρωτεΐνες κυρίως ιντεγκρίνες και πρωτεΐνες εξωκυτταρικής μήτρας όπως φιμπρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη και ενισχύονται από δισθενή κατιόντα (π.χ. οι αλληλεπιδράσεις φιμπρονεκτίνης - ιντεγκρίνης προωθούνται από ιόντα  $Ca^{++}$ ). Συγκεκριμένα, διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Συνεπώς με τη χρήση της τρυψίνης επιτυγχάνεται η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας.

#### **FBS (*Fetal Bovine Serum*, εμβρυϊκός βόειος ορός)**

Παρέχει στα κύτταρα τα θρεπτικά συστατικά και τους παράγοντες που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Επιπλέον, προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη και από απόπτωση σε αντίθεση με θρεπτικά μέσα καλλιέργειας από τα οποία ο ορός απουσιάζει. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 10% στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας Προμηθεύεται από την εταιρεία Gibco με αριθμό καταλόγου 10270 - 106. Για την αποφυγή ενεργοποίησης του συμπληρώματος πριν τη χρήση του ο ορός απενεργοποιείται με θέρμανση στους 55° C για 30 λεπτά και στη συνέχεια δημιουργούνται aliquots των 50 ml τα οποία αποθηκεύονται στους - 20° C.

#### **Διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης**

Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνται με σκοπό την πρόληψη βακτηριακής μόλυνσης των κυτταρικών καλλιεργειών λόγω της αποτελεσματικής συνδυασμένης δράσης τους έναντι των Gram(+) και Gram(-) βακτηρίων.

Η πενικιλίνη, αρχικά απομονώθηκε από τον μύκητα *Penicillium*. Δρα παρεμβαίνοντας άμεσα στον κύκλο σχηματισμού του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και έμμεσα προκαλώντας την απελευθέρωση των ενζύμων που μεταβάλλουν περαιτέρω το κυτταρικό τοίχωμα.

Η στρεπτομυκίνη, αρχικά απομονώθηκε από τον *Streptomyces griseus*. Δρα μέσω της σύνδεσης με την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, οδηγώντας σε αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης συνεπώς στο θάνατο των βακτηρίων.

Τα αντιβιοτικά διατίθενται σε διάλυμα 10X αλλά η τελική συγκέντρωση (1X) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είναι 10,000 units/mL πενικιλίνης και 10,000 μg/mL στρεπτομυκίνης. Προμηθεύονται από την εταιρεία Gibco με αριθμό καταλόγου 15140 -122.

#### **DMSO** (*Dimethyl Sulfoxide*)

Προμηθεύεται από την εταιρεία Sigma – Aldrich με κωδικό D8418. Χρησιμοποιείται στο διάλυμα παγώματος (freezing medium), σε τελική συγκέντρωση 10% (κατ' όγκο), έτσι ώστε να τροποποιείται η κυτταρική μεμβράνη και να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου, οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν μηχανική βλάβη στα κύτταρα.

#### **Ετοποσίδη** (*etoposide*)

Προμηθεύεται από την εταιρεία Sigma – Aldrich με αριθμό καταλόγου E1383. Χρησιμοποιείται ως δείγμα θετικού ελέγχου (positive control) του κυτταρικού θανάτου, καθώς αναμένεται πλήρης κυτταρικός θάνατος στα κύτταρα που επωάζονται με ετοποσίδη.

#### **XTT Cell Proliferation Kit II**

Προμηθεύεται από την εταιρεία Roche με αριθμό καταλόγου 11 465 015 001. Πρόκειται για μια μη ραδιενεργή, χρωματομετρική, μέθοδο ποσοτικοποίησης της κυτταρικής επιβίωσης και ανάπτυξης, η οποία αναλύεται με λεπτομέρεια παρακάτω.

## Βετουλινικό Οξύ (Betulinic Acid)

Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, προϊόντα των εταιριών: Sigma – Aldrich και Phytolab. Συγκεκριμένα, τα αντιδραστήρια είχαν κωδικό αριθμό : **bar # 89529 (Phytolab)** και **bet # 1095 (Sigma)**.

## 2. Καρκινικές κυτταρικές σειρές

Στην δεδομένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες καρκινικές κυτταρικές σειρές,

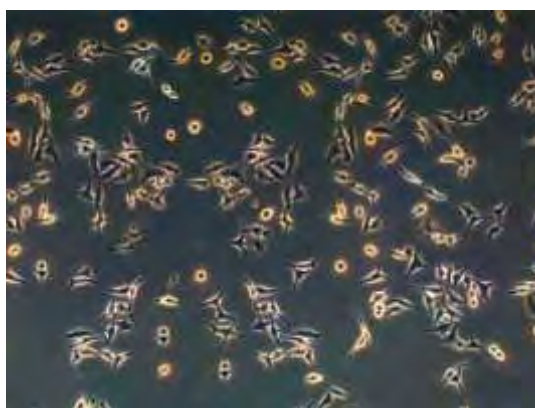
- I. Κυτταρική σειρά HeLa, που προέρχεται από ενδομητριακό αδενοκαρκίνωμα
- II. Κυτταρική σειρά MCF – 7 που προέρχεται από μαστικό αδενοκαρκίνωμα

Τα κύτταρα **HeLa** (human cervix adenocarcinoma) είναι μια κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Απομονώθηκαν από την Henrietta Lacks, μια νεαρή ασθενή στην οποία διαγνώστηκε επιθετικό αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, το 1952. Μετά το πέρας 8 μηνών από την διάγνωση, η Henrietta πέθανε. Όμως η συμβολή της στην επιστήμη ήταν καθοριστική καθώς τα καρκινικά της κύτταρα διατηρήθηκαν και αποτέλεσαν τα πρώτα ανθρώπινα κύτταρα που μπορούσαν να διατηρηθούν σε καλλιέργεια μέσα στο εργαστήριο και να αναπτύσσονται διαρκώς. Το όνομα τους HeLa, προέρχεται από το δικό της όνομα (**Henrietta Lacks**) και μέχρι σήμερα αποτελούν την πιο συνηθισμένη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται από την επιστημονική κοινότητα σε μια ευρεία ομάδα μελετών.

Τα κύτταρα HeLa έχουν την εξαιρετική ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται αφύσικα ραγδαία σε σύγκριση με άλλα καρκινικά κύτταρα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν μια ενεργή μορφή τελομεράσης κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, η οποία εμποδίζει την αυξανόμενη βράχυνση των τελομερών και διατηρεί το μήκος τους. Τα τελομερή είναι τμήματα DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων τα οποία αδυνατούν να αντιγραφούν και χάνονται μετά από κάθε διπλασιασμό του DNA. Μετά από πολλές διαιρέσεις, τα τελομερή μικραίνουν αρκετά και το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Αυτό είναι ένας

μηχανισμός με τον οποίο το κύτταρο αποφεύγει τα λάθη της αντιγραφής που πιθανότατα σχετίζονται με μεταλλάξεις (**Εικ. 1.9**).

Τα καρκινικά κύτταρα συνεπώς, αποκτούν ένα άπειρο δυναμικό διπλασιασμού που τα καθιστά αθάνατα. Το φαινόμενο Hayflick ή γνωστό και ως hayflick limit, αφορά το σύνολο των φορών στις οποίες ένα φυσιολογικός ανθρώπινος κυτταρικός πληθυσμός, έχει την δυνατότητα να διαιρείται προτού η κυτταρική διαίρεση λάβει τέλος. Τα καρκινικά κύτταρα HeLa υπερβαίνουν κατά πολύ αυτό το όριο.

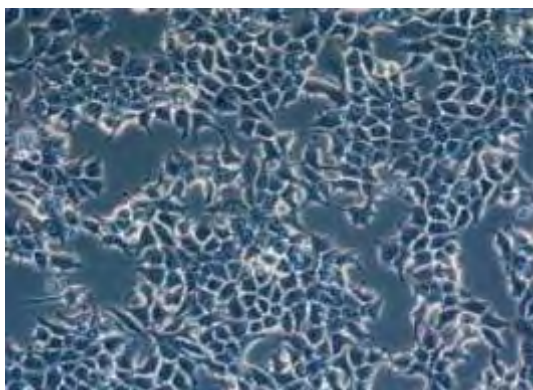


**Εικόνα 1.9** Καρκινική κυτταρική σειρά HeLa (από <http://gardenofpraise.com>)

Τα κύτταρα **MCF-7** (human breast adenocarcinoma cell line) είναι μια κυτταρική σειρά η οποία πρώτα απομονώθηκε το 1970 από έναν μαστικό ιστό μιας 69χρονης Κανκάσιας γυναίκας. Από τις δύο μαστεκτομές στις οποίες υποβλήθει, η πρώτη αποκάλυψε ότι ο ιστός που αφαιρέθηκε ήταν καλοήθης αλλά έπειτα από 5 χρόνια που πραγματοποιήθηκε η δεύτερη εγχείρηση, αποκαλύφθηκε κακοήθες αδеноκαρκίνωμα από το οποίο προήλθαν και τα κύτταρα MCF – 7.

MCF-7 είναι το ακρωνύμιο του Michigan Cancer Foundation – 7, που αναφέρεται στο ινστιτούτο στο Ντιτρόιτ, όπου και η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά καθιερώθηκε. Είναι πολύ χρήσιμα κύτταρα για *in vitro* μελέτες του καρκίνου του μαστού, καθότι αυτή η κυτταρική σειρά έχει διατηρήσει εξαιρετικά τα χαρακτηριστικά του μαστικού επιθηλίου, δηλαδή την ικανότητα του να επεξεργάζεται τα οιστρογόνα και να τα μετατρέπει σε οιστραδιόλη, μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Εκτός από

υποδοχείς οιστρογόνων, διαθέτουν και υποδοχείς προγεστερόνης. Όταν αναπτύσσονται in vitro τα κύτταρα MCF-7, δημιουργούν συσσωματώματα και τα κύτταρα που μοιάζουν με τα επιθηλιακά μεγαλώνουν σε μονοστιβάδες. Η ανάπτυξη τους αναστέλλεται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ). Κυτταρογενετικές μελέτες δείχνουν ότι πρόκειται για μια κυτταρική σειρά 69 χρωμοσωμάτων (Εικ.1.10)



**Εικόνα 1.10** Καρκινική κυτταρική σειρά Mcf-7 (από <http://www.gdbiotec.com>)

### 3. Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

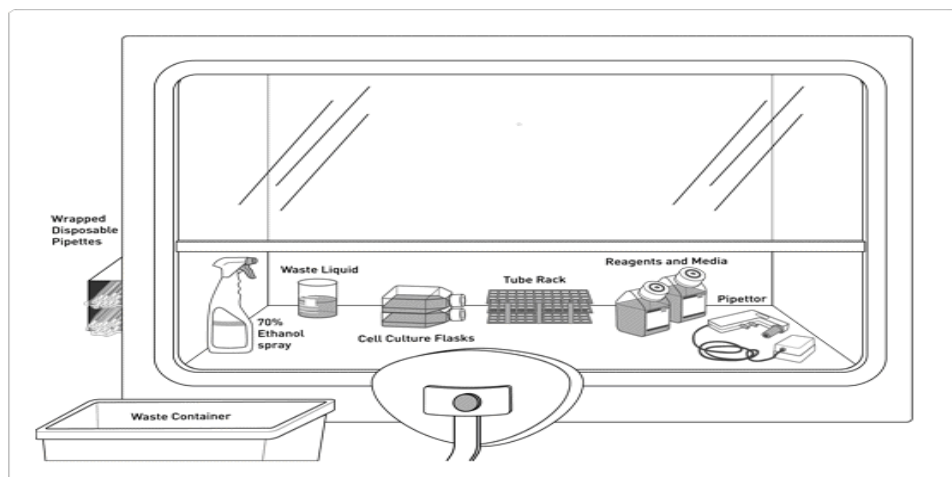
#### 3.1 Συντήρηση των κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια

Η συντήρηση των κυττάρων σε καλλιέργεια γίνεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο αποτελείται από υλικό DMEM εμπλουτισμένο με FBS, σε τελική συγκέντρωση 10% (κατ' όγκο), παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης σε τελική συγκέντρωση 100 units/mL και 100  $\mu$ g/mL αντίστοιχα. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται μετά την παρασκευή του σε ψυγείο θερμοκρασίας 4° C. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το θρεπτικό υλικό, όπως και όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, πριν την εφαρμογή τους στα κύτταρα, είναι αναγκαίο να προθερμανθούν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C.

Όλες οι διαδικασίες χειρισμού των κυττάρων που αναφέρονται στη συνέχεια πραγματοποιούνται σε πλήρως αποστειρωμένο περιβάλλον σε θάλαμο καθέτου

νηματικής ροής (laminar flow hood) βιοασφάλειας II της εταιρίας Tel Star AV-30/70. Οι διαδικασίες χειρισμού των κυττάρων πρέπει να επιτελούνται σε απόλυτα στείρες συνθήκες, ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις από αερομεταφερόμενες ουσίες, αλλά και για την προστασία των χειριστών. Ο καθαρισμός της επιφάνειας εργασίας, όλων των αντικειμένων και σκευών, αλλά και των θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται, γίνεται με ψέκασμα με διάλυμα 70% αιθανόλης.

Επίσης, είναι απαραίτητο να οργανωθεί η επιφάνεια εργασίας όπως φαίνεται ενδεικτικά στην **Εικ. 1.11**, μέσω της κατάλληλης τοποθέτησης του εξοπλισμού για να διευκολύνονται όλες οι διαδικασίες.



**Εικόνα 1.11** Η βασική διάταξη των αντικειμένων στην επιφάνεια εργασίας εντός του θαλάμου (από <http://asepticsupplies.co.uk>)

### 3.2 Ανακαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλαστικές, πλήρως αποστειρωμένες, φλάσκες των 25 cm<sup>2</sup> (T<sub>25</sub>) ή των 75 cm<sup>2</sup> (T<sub>75</sub>), οι οποίες φυλάσσονται σε ειδικό επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37° C παρουσία CO<sub>2</sub> 5% και 95% αέρα. Πάνω στην επιφάνεια κάθε φλάσκας σημειώνεται ο αριθμός περάσματος (passage), δηλαδή ο αριθμός της ανακαλλιέργειας (subculture), το είδος της κυτταρικής σειράς και η ημερομηνία επεξεργασίας της.

Η μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων γίνεται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης της εταιρείας Kruss. Καθώς τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φλάσκες καλλιέργειας φαίνεται ότι καταλαμβάνουν ολόκληρη την επιφάνεια της αλλά είναι ορατή η τάση τους να συσσωρεύονται περισσότερο στα τοιχώματα της φλάσκας. Όταν καλυφθεί περίπου το 70 - 80% της επιφάνειας καλλιέργειας, τα κύτταρα δεν έχουν χώρο για να μεγαλώσουν περαιτέρω και αρχίζει αναστολή της ανάπτυξης τους, λόγω επαφής τους με τα γειτονικά τους κύτταρα. Εξαιτίας του πολλαπλασιασμού τους, το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας θα αρχίσει να εξαντλείται και να αλλάζει χρώμα (από πορτοκαλοκόκκινο γίνεται κιτρινωπό). Στο στάδιο αυτό είναι απαραίτητη η μεταφορά τους σε νέα φλάσκα καλλιέργειας.

Τα κύτταρα ελέγχονται σε καθημερινή βάση και ανά 2-3 μέρες πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας. Για την μεταφορά των κυττάρων από την μια φλάσκα σε άλλη, πρέπει να αποκολληθούν από την αρχική. Τα κύτταρα όταν είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας έχουν επίμηκες σχήμα και δεν μετακινούνται στο εναιώρημα. Όταν όμως αποκολλούνται, το σχήμα τους μεταβάλλεται, γίνεται σφαιρικό και έτσι φαίνονται να επιπλέουν. Η διαδικασία αποκόλλησης των κυττάρων από την φλάσκα καλλιέργειας ονομάζεται τρυψινοποίηση και περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Σε πρώτο στάδιο, αφαιρείται το παλιό θρεπτικό υλικό από την φλάσκα μέσω μιας αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας Pasteur η οποία συνδέεται με αντλία κενού. Έπειτα, η φλάσκα ξεπλένεται με PBS. Ο όγκος του PBS που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το μέγεθος της φλάσκας και είναι ενδεικτικά 4 ml PBS για την φλάσκα 25 cm<sup>2</sup> και 8 ml PBS για την φλάσκα 75 cm<sup>2</sup>. Ο σκοπός της έκπλυσης είναι η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού που είναι ικανά να αναστείλουν τη δράση της τρυψίνης. Μετά την απομάκρυνση του PBS προστίθεται διάλυμα τρυψίνης – EDTA, ώστε να γίνει διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών που συγκρατούν τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας αλλά και μεταξύ τους. Ο όγκος του διαλύματος τρυψίνης – EDTA καθορίζεται από το μέγεθος της φλάσκας και είναι ενδεικτικά 0,75 ml για την φλάσκα των 25 cm<sup>2</sup> και 1,5 ml για την φλάσκα των 75 cm<sup>2</sup>. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για μερικά λεπτά και ύστερα μηχανική ανάδευση του περιεχομένου της φλάσκας μέσω της πιπέτας, ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια της με το διάλυμα της τρυψίνης, να αποκολληθούν όλα τα κύτταρα και να διαλυθούν συσσωματώματα τα οποία μπορεί να έχουν σχηματιστεί. Εναλλακτικά, η επώαση με την τρυψίνη μπορεί να

διαρκέσει μικρότερο χρονικό διάστημα μέσα όταν πραγματοποιηθεί στον επωαστικό κλίβανο των 37° C, Για να επιβεβαιωθεί ότι όλα τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας, λαμβάνουμε μια πρώτη εικόνα με το μάτι. Μια καλή ένδειξη αποτελεί η θολερότητα του υγρού εντός της φλάσκας, ενώ για μεγαλύτερη σιγουριά, πραγματοποιείται έλεγχος μέσω του μικροσκοπίου, όπου αναμένεται τα κύτταρα να είναι σφαιρικά και να αιωρούνται.

Στη συνέχεια, μεταφέρεται πλήρες θρεπτικό υλικό στη φλάσκα, ενδεικτικά 4 ml στην T<sub>25</sub> και 8 ml στην T<sub>75</sub>, αναμιγνύεται με το διάλυμα τρυψίνης και τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί και το μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάριο falcon των 15 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 900 στροφές, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 22° C. Η φυγοκέντρηση γίνεται με στόχο να κατακρίμνηστούν τα κύτταρα και στη συνέχεια να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα και τα κύτταρα να κατανεμηθούν πιο ομοιόμορφα στη νέα φλάσκα καλλιέργειας. Μετά την φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Μια ποσότητα από το εναιώρημα κυττάρων (συνήθως 1:5–1:10 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις ανάγκες του πειράματος) μεταφέρεται σε νέα φλάσκα που περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο. Ο τελικός όγκος του θρεπτικού μέσου είναι 5 ml για την φλάσκα T<sub>25</sub> και 15 ml για την φλάσκα T<sub>75</sub>.

Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο της εταιρίας RS BIOTECH σε θερμοκρασία 37° C παρουσία CO<sub>2</sub> 5% και 95% αέρα. Είναι πολύ σημαντικό αυτές οι συνθήκες να μην διαταράσσονται καθότι οποιαδήποτε αλλαγή τους είναι ικανή να επηρεάσει την ζωτικότητα των κυττάρων.

### ***3.3 Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας***

Για την μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων εκτός καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε πάγωμα-ψύξη τους σε ειδικό μέσο (freezing medium). Τα 'παγωμένα' κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία – 80° C για διάστημα μερικών μηνών, ή σε δοχεία υγρού αζώτου για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Το υλικό παγώματος (freezing medium) αποτελείται από πλήρες θρεπτικό υλικό και DMSO ή ορό και DMSO. Η τελική συγκέντρωση του DMSO στο υλικό παγώματος είναι 10% (κατ' όγκο).



Το DMSO είναι ένας εξαιρετικός πολικός και ουσιαστικά απρωτικός διαλύτης (polar aprotic solvent), δηλαδή διίσταται, παρέχοντας πρωτόνια, σε απειροελάχιστο βαθμό. Η μεγάλη διπολική ροπή του μορίου του DMSO το καθιστά ικανό να σχηματίζει συζεύγματα και ενώσεις προσθήκης με πλήθος οργανικών και ανόργανων μορίων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε χημικές αντιδράσεις, σε αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αλλά και σαν κρυοπροστατευτικός (cryoprotectant) ή κρυοσυντηρητικός (cryopreservative) παράγοντας για τη διατήρηση κυττάρων, ιστών και οργάνων. Η χρήση του DMSO δεν επιτρέπει τον σχηματισμό κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα, με αποτέλεσμα την προστασία των κυττάρων.

Στη συνέχεια περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία του παγώματος και του ξεπαγώματος των κυττάρων.

### **3.4 Ψύξη - Πάγωμα κυττάρων**

Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS (5 ml για την T<sub>25</sub> και 10 ml για την T<sub>75</sub>). Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα τρυψίνης (0,75 ml για την T<sub>25</sub> και 1,5 ml για την T<sub>75</sub>) και τα κύτταρα, είτε τοποθετούνται για λίγα λεπτά στους 37° C, είτε παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να δράσει η τρυψίνη. Έπειτα, και εφόσον τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί, γίνεται ανάδευση μέσω μιας πιπέτας πολύ καλά και προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό. Το διάλυμα εισάγεται σε ένα σωληνάριο falcon των 15 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 900 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 5° C. Μετά την φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο του σωληναρίου falcon (με χρήση πιπέτας Pasteur και αντλίας κενού) και το ίζημα επαναδιαλύεται σε μείγμα παγώματος (freezing medium). Το μείγμα παγώματος αποτελείται είτε από DMSO (10% κατ' όγκο) σε FBS ή από DMSO (10%) σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία 10% FBS. Ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων της φλάσκας καλλιέργειας, ενδεικτικά δημιουργούνται 2 αμπούλες (cryovials) από την φλάσκα των 25 cm<sup>2</sup> και 3 αμπούλες από την φλάσκα των 75 cm<sup>2</sup>.

Τα κύτταρα ψύχονται σταδιακά, δηλαδή τα cryovials αρχικά τοποθετούνται στους -20° C για λίγες ώρες και ακολούθως μεταφέρονται στους -80° C για

διάστημα λίγων μηνών ενώ για μακροχρόνια αποθήκευση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο. Είναι αναγκαίο σε κάθε cryovial να αναγράφεται το είδος της κυτταρικής σειράς, ενδεικτικός αριθμός κυττάρων, η ημερομηνία παγώματος και ο αριθμός περασμάτων της φλάσκας.

### **3.5 Ξεπάγωμα κυττάρων**

Το ξεπάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα κυτταρικού θανάτου. Αρχικά τα cryovials μεταφέρονται άμεσα από το καταψύκτη ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) ή από το υγρό άζωτο, στο υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  και, αναδεύονται με διαρκή ανακίνηση δεξιά – αριστερά έως ότου ξεπαγώσουν εντελώς τα κύτταρα και στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωληνάρια falcons των 15 ml που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό (ενδεικτικά 5 ml) και αναδεύονται με χρήση πιπέτας, ώστε να αναμειχθούν πλήρως. Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου τους σε φλάσκες είτε των 25 είτε των  $75\text{ cm}^2$  (ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων) και τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Εναλλακτικά, μπορεί, πριν την μεταφορά στις φλάσκες, να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση των κυττάρων στο σωληνάριο falcon, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να υπάρχουν υπολείμματα DMSO από το freezing medium και να επαναδιαλυθεί το ίζημα σε νέο πλήρες θρεπτικό υλικό. Αυτή η διαδικασία μπορεί να αποφευχθεί εάν αντικαταστήσουμε το θρεπτικό υλικό της φλάσκας την επόμενη μέρα. Είναι σημαντικό στην επιφάνεια της φλάσκας να αναγράφεται ο αριθμός των περασμάτων της κάθε κυτταρικής σειράς.

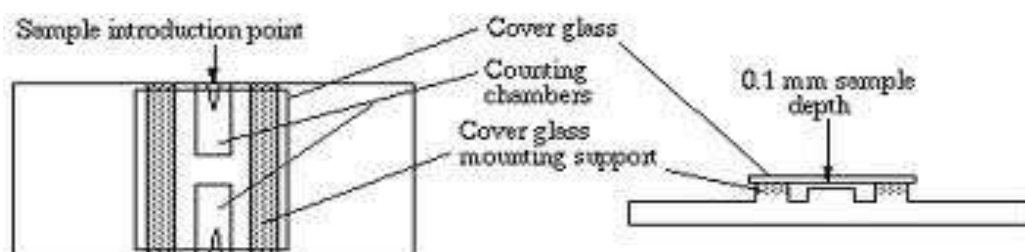
### **3.6 Μέτρηση κυττάρων με την χρήση αιμοκυτταρόμετρου**

Είναι απαραίτητο, για την ορθή διεξαγωγή των πειραμάτων, να χρησιμοποιείται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων. Για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων σε εναιώρημα χρησιμοποιείται το αιμοκυτταρόμετρο (ή πλάκα Neubauer) και ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Σε πρώτο στάδιο, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS. Έπειτα προστίθεται διάλυμα τρυψίνης-EDTA και τα κύτταρα επωάζονται (είτε σε θερμοκρασία δωματίου, είτε στους  $37^{\circ}\text{C}$

C) μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν πλήρως από την φλάσκα. Τότε για την αδρανοποίηση της τρυψίνης προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό και το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε σωληνάριο falcon των 15 ml. Το falcon φυγοκεντρείται στις 900 - 1000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 5 λεπτά και στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί καλή ανάδευση, ώστε να διαλυθούν τυχόν κυτταρικά συσσωματώματα, και μια ποσότητα 10  $\mu$ l από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρονται στην πλάκα Neubauer.

Το αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer) αποτελεί την πιο απλή, άμεση και οικονομική μέθοδο υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Πρόκειται για μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρο πλάκα που έχει δύο λείες επιφάνειες επεξεργασμένες έτσι ώστε κάθε μια να έχει ένα τετράγωνο πλέγμα. Το πλέγμα αυτό αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm και κάθε ένα από αυτά ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5  $\mu$ m. Αυτές βοηθούν στον προσδιορισμό των κυττάρων, αν δηλαδή αυτά θα βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επιπροσθέτως, κάθε ένα από τα κύρια αυτά τετράγωνα έχει και κάποιες άλλες διαβαθμίσεις με σκοπό να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Η καλυπτρίδα που χρησιμοποιείται στηρίζεται πάνω σε δύο λεγόμενες «ράχες» από τις οποίες το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα. Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε λείας επιφανείας και των σημείων που η καλυπτρίδα στερεώνεται, σχηματίζεται μια κοίλη επιφάνεια όπου γίνεται η μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος και το οποίο μέσω τριχοειδών φαινομένων απλώνεται πάνω στην τετραγωνισμένη επιφάνεια (Εικ. 1.12)

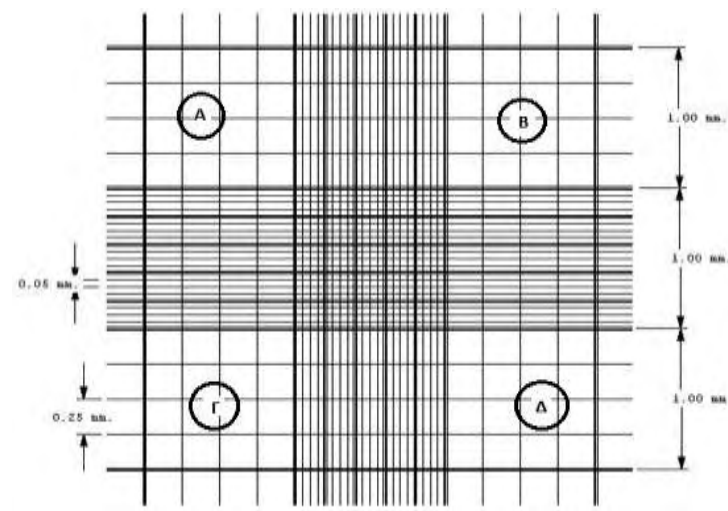


**Εικόνα 1.12** Η δομή του πλακιδίου Neubauer

Μετά την παρατήρηση του πλακιδίου στο μικροσκόπιο, εντοπίζονται τέσσερα γωνιακά τετράγωνα όπου και γίνεται η μέτρηση των κυττάρων, αλλά και ένας σχηματιζόμενος σταυρός κεντρικά της επιφάνειας.

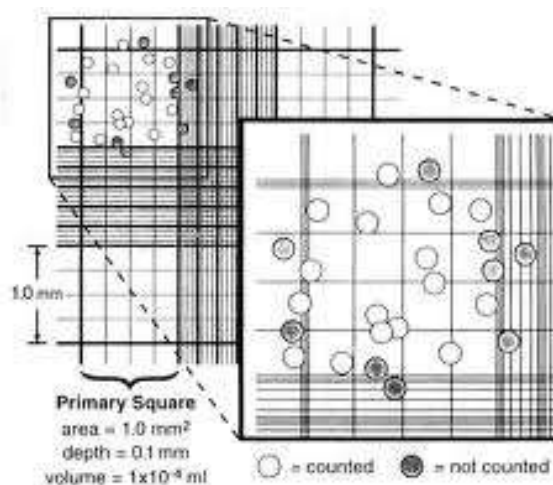
Τα τετράγωνα χαρακτηρίζονται με κεφαλαία γράμματα πχ Α,Β,Γ,Δ. Ξεκινώντας από το πρώτο τετράγωνο, μετράται πόσα κύτταρα εντοπίζονται μέσα σε αυτό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα τέσσερα τετράγωνα και στο τέλος αυτά αθροίζονται και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους δηλαδή:  $(A + B + \Gamma + \Delta) / 4$ . Συχνά, επιλέγεται η μια κάθετη και η μία οριζόντια γραμμή, και συνυπολογίζονται και τα κύτταρα που κατανεμήθηκαν πάνω σε αυτές. Τα σύνολα των κυττάρων ανά τετράγωνο θα πρέπει να έχουν παρόμοιες τιμές. Αν οι τιμές τους αποκλίνουν σημαντικά, είτε επαναλαμβάνεται η μέτρηση με νέο εναιώρημα, είτε μετρώνται και τα κύτταρα που υπάρχουν στο κεντρικό τετράγωνο εντός του σταυρού. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι  $0,1 \text{ mm}^3$  ή  $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$ . Έτσι η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/ml) είναι ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων πολλαπλασιαζόμενος επί  $10^4$  δηλαδή :  $(A + B + \Gamma + \Delta) / 4 \times 10^4$  **κύτταρα/ml**.

Στην **Εικόνα 1.13** φαίνεται η επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου όπου απεικονίζονται τα γωνιακά τετράγωνα για την μέτρηση των κυττάρων.



**Εικόνα 1.13** Σχήμα στην επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου όπου γίνεται η μέτρηση των κυττάρων (Αναπροσαρμογή από <http://www.emsdiatum.com>)

Εν συνεχεία, φαίνεται σχηματικά ο τρόπος υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων μέσω του Neubauer.



**Εικόνα 1.14** Τρόπος υπολογισμού των κυττάρων στο Neubauer: Το ένθετο (μεγεθυμένο) δείχνει κύτταρα που έχουν κατανεμηθεί σε ένα τετράγωνο. Τα κύτταρα που βρίσκονται εντός, ή που ακουμπούν το αριστερό ή το πάνω όριο του, υπολογίζονται, ενώ εκείνα που αγγίζουν ή είναι έξω από το κάτω ή το δεξιό όριο δεν υπολογίζονται κατά την μέτρηση (από <http://www.cf.ac.uk>)

### 3.7 Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο XTT

#### 3.7.1 Αρχή της μεθόδου

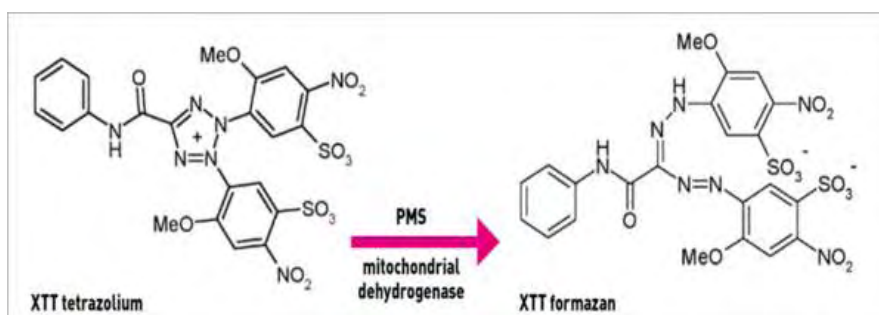
Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μια μη – ραδιενεργή, χρωματομετρική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των κυττάρων.

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση του αντιδραστηρίου XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carbox-anilide) το οποίο για πρώτη φορά περιγράφηκε από τους Studiero et al το 1988 ως μια αποτελεσματική μέθοδος για την μέτρηση της κυτταρικής αύξησης και της ευαισθησίας φαρμάκων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και βελτιώθηκε τα επόμενα χρόνια από άλλους ερευνητές. Άλατα τετραζολίου όπως είναι το XTT, έχουν

χρησιμοποιηθεί ευρέως ως αντιδραστήρια ανίχνευσης σε ιστοχημικές μελέτες εντοπισμού και στην κυτταρική βιολογία.

Ουσιαστικά, η μέθοδος διακρίνεται από τον σχηματισμό μιας υδατοδιαλυτής χρωστικής πορτοκαλί χρώματος, η οποία προκύπτει από την αναγωγή του κίτρινου άλατος τετραζολίου XTT και συμβαίνει μόνο στα ζωντανά κύτταρα. Οι μιτοχονδριακές οξειδοαναγωγάσες θεωρείται ότι συμβάλλουν ουσιαστικά στην αλληλεπίδραση του XTT με τα αναγωγικά που μεταφέρονται στη πλασματική μεμβράνη. Η αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων οδηγεί στην αύξηση της ολικής δραστηριότητας των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών στο δείγμα, η οποία αντιπροσωπεύεται άμεσα από την ποσότητα της πορτοκαλί φορμαζάνης που δημιουργείται. Η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης και ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος συμβάλλει άμεσα στον προσδιορισμό της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων και έμμεσα στον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η τιμή της οπτικής απορρόφησης του διαλύματος των κρυστάλλων φορμαζάνης είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

Ο μεταβολισμός του XTT απεικονίζεται στην **Εικόνα 1.15**.

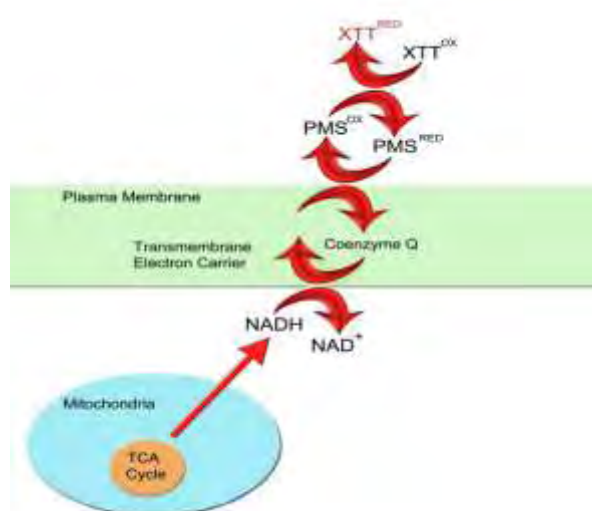


**Εικόνα 1.15** Αναγωγή του αντιδραστηρίου XTT στο έγχρωμο παράγωγο φορμαζάνης διαμέσω μιτοχονδριακών αφυδρογονασών και PMS (από [www.appllichem.com](http://www.appllichem.com))

Η ευαισθησία της χρωστικής XTT έχει βελτιωθεί σημαντικά με τη χρήση ενός ενδιάμεσου φορέα ηλεκτρονίων, το PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate). Το PMS βοηθάει στην αναγωγή του XTT και στον σχηματισμό της φορμαζάνης. Θεωρείται ως ένα αντιδραστήριο ενεργοποίησης που συγκεντρώνει ηλεκτρόνια στην επιφάνεια του κυττάρου, ή σε μια θέση στη πλασματική

μεμβράνη που είναι εύκολα προσβάσιμη, και σχηματίζει ένα αντιδραστικό ενδιάμεσο που στη συνέχεια ανάγει το XTT σε ένα ιδιαίτερα χρωματισμένο προϊόν φορμαζάνης. Η αλλαγή χρώματος επιτυγχάνεται με το σπάσιμο του θετικά φορτισμένου δακτυλίου της τεταρτοταγούς τετραζόλης δίνοντας ένα υδατοδιαλυτό προϊόν αναγωγής (φορμαζάνη). Σημαντικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η αναγωγή της χρωστικής XTT λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια των κυττάρων καθώς το XTT δεν μπορεί να εισαχθεί στα κύτταρα λόγω του αρνητικού φορτίου του.

Ο τρόπος αναγωγής με την βοήθεια του PMS συνοψίζεται στην **Εικόνα 1.16**:



**Εικόνα 1.16** Χρωματομετρική αναγωγή του XTT από κυτταρικά ένζυμα

Η χρωστική φορμαζάνη μπορεί εύκολα και με μεγάλη ακρίβεια να ποσοτικοποιηθεί μέσω της χρήσης ενός φασματοφωτόμετρου (ELISA reader). Η χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή για την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι εφικτή και μπορεί να πραγματοποιηθεί και για το χειρισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Η μέθοδος αυτή συγκεντρώνει αρκετά πλεονεκτήματα. Είναι ασφαλής, καθώς δεν απαιτείται η χρήση ραδιενεργών ισοτόπων. Είναι απόλυτα ακριβής, αφού η απορρόφηση που δίνεται σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των κυττάρων, αλλά και ευαίσθητη, εφόσον μπορεί να ανιχνευθεί και μικρός αριθμός κυττάρων. Επιπλέον, είναι αρκετά γρήγορη και εύκολη αν αναλογιστεί κανείς ότι δεν είναι αναγκαία ενδιάμεσα στάδια πλύσεων και επιπλέον αντιδραστήρια. Τέλος,

πλεονεκτεί σημαντικά σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως την MTT, καθώς παραλείπεται το στάδιο της διαλυτοποίησης.

Η μέθοδος XTT εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα χρήσεων που ενδεικτικά περιλαμβάνουν τον υπολογισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με απόκριση σε παράγοντες ανάπτυξης, κυτοκίνες και θρεπτικά καθώς και την εκτίμηση κυτταροτοξικότητας και ανάπτυξης παραγόντων αναστολής, όπως ανασταλτικά μονοκλωνικά αντισώματα.

### **3.7.2 Πειραματική διαδικασία XTT**

Στο πρώτο στάδιο αυτής της διεργασίας περιλαμβάνεται η επίστρωση των κυττάρων σε ένα τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate) (Εικ.1.17). Προκειμένου να επιστρωθεί ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε κάθε βοθρίο-πηγαδάκι του τρυβλίου είναι σημαντικό να γίνει πρώτα ένα πείραμα τιτλοδότησης ξεχωριστά για την κάθε κυτταρική σειρά. Ενδεικτικά, εξετάστηκαν διαφορετικοί αριθμοί κυττάρων (7.500, 10.000, 12.500, 15.000, 17.500, 20.000 και 22.500) σε συνδυασμό με διαφορετικούς χρόνους επώασης (2, 6 και 24 ώρες) με το αντιδραστήριο XTT. Όπως θα περιγραφεί στα αποτελέσματα, το πείραμα τιτλοδότησης έδειξε ότι ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων είναι 14.000 κύτταρα/βοθρίο σε συνδυασμό με 4 ή 6 ώρες επώασης με το αντιδραστήριο XTT.

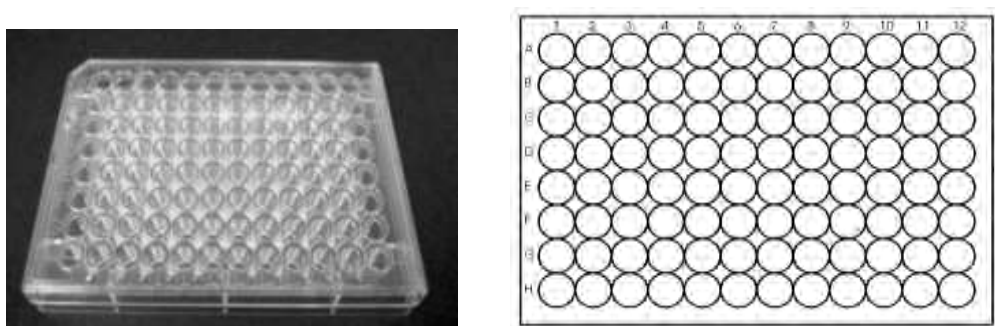
Αρχικά τα κύτταρα αποκολλούνται από τις φλάσκες καλλιέργειας με την δράση τρυψίνης, καταμετρούνται και υπολογίζεται ο όγκος που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων. Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (παρουσία ορού) και προστίθεται 14.000 κύτταρα/βοθρίο σε τελικό όγκο 150 μl ανά βοθρίο. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο των 37° C, και ελέγχονται σε μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί ότι έχουν προσκολληθεί και ότι έχουν καλύψει με ομοιόμορφο τρόπο την επιφάνεια του τρυβλίου. Μετά απομακρύνεται το πλήρες θρεπτικό υλικό και προστίθεται νέο θρεπτικό μέσο (DMEM) με αντιβιοτικά, αλλά απουσία ορού μαζί με την υπό μελέτη ουσία στην κατάλληλη συγκέντρωση (διαφορετικές αραιώσεις του εκχυλίσματος) σε τελικό όγκο 100 μl ανά well. Το κάθε πείραμα περιλαμβάνει εκτός από την υπό μελέτη ουσία τα ακόλουθα δείγματα:

α) Κύτταρα ελέγχου (*control*): κύτταρα που επωάζονται παρουσία θρεπτικού και αντιβιοτικών και απουσία του φυτικού εκχυλίσματος και του ορού. Είναι



σημαντικό να υπάρχουν τουλάχιστον τρία δείγματα ελέγχου ανά πείραμα, ώστε να επιτυγχάνεται η σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία έχουμε προσθέσει την ουσία.

β) Κύτταρα που επωάζονται με το αντικαρκινικό φάρμακο ετοποσίδη. Τα δείγματα αυτά λειτουργούν ως *θετικοί μάρτυρες κυτταρικού θανάτου* καθότι αναμένεται πλήρης κυτταρικός θάνατος. Η ετοποσίδη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο, το οποίο δρα έχει την δυνατότητα να δημιουργεί σύμπλοκα με το ένζυμο τοποϊσομεράση II και το DNA, και επάγει ρήξεις της διπλής έλικας του DNA, οι οποίες είναι μη αναστρέψιμες.



**Εικόνα 1.17** Τρυβλίο 96 βοθρίων ή 96-well plate που χρησιμοποιήθηκε στη διεξαγωγή των πειραμάτων (από <http://www.n3dbio.com>, <http://cellbiology.med.unsw.edu.au/>)

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στον επωαστικό κλίβανο των 37° C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και 95% αέρα. Το υλικό του κάθε βοθρίου ανανεώνεται μετά από 48 ώρες. Μετά το πέρας της τρίτης ημέρας προστίθεται το αντιδραστήριο XTT σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται 2 αντιδραστήρια, τα A και B.

Το *αντιδραστήριο A* καλείται XTT labelling reagent και περιέχει XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]- bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonicacid hydrate) σε RPMI 1640.

Το *αντιδραστήριο B* καλείται electron-coupling reagent και περιέχει 0.383 mg/ml PMS (N-methyldibenzopyrazine methyl sul-fate) σε αποστειρωμένο διάλυμα PBS. Η αναλογία των αντιδραστηρίων A:B πρέπει να είναι 50:1. Τα αντιδραστήρια A και B αναμειγνύονται λίγο πριν την χρήση τους και χρησιμοποιούνται 50 μl από το μείγμα σε κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου. Τα δείγματα επωάζονται για ακόμη 4

ώρες και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασφατοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) με χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Τα αποτελέσματα μεταφέρονται σε αρχείο excel για περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία.

### **3.8 Υπολογισμός του ποσοστού αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης**

Ο υπολογισμός του ποσοστού αναστολής (επί της εκατό, %) της κυτταρικής ανάπτυξης στα υπό εξέταση δείγματα υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{ Αναστολή} = O.D \text{ (control)} - O.D \text{ (δείγματος)} / O.D \text{ (control)} * 100$$

όπου:

***O.D (control)*** → τιμή απορρόφησης του δείγματος ελέγχου, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που περιέχουν μόνο κύτταρα, απουσία της υπό μελέτη ουσίας

***O.D (δείγματος)*** → τιμή απορρόφησης των υπό εξέταση δειγμάτων, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που περιέχουν κύτταρα παρουσία της υπό μελέτης ουσίας

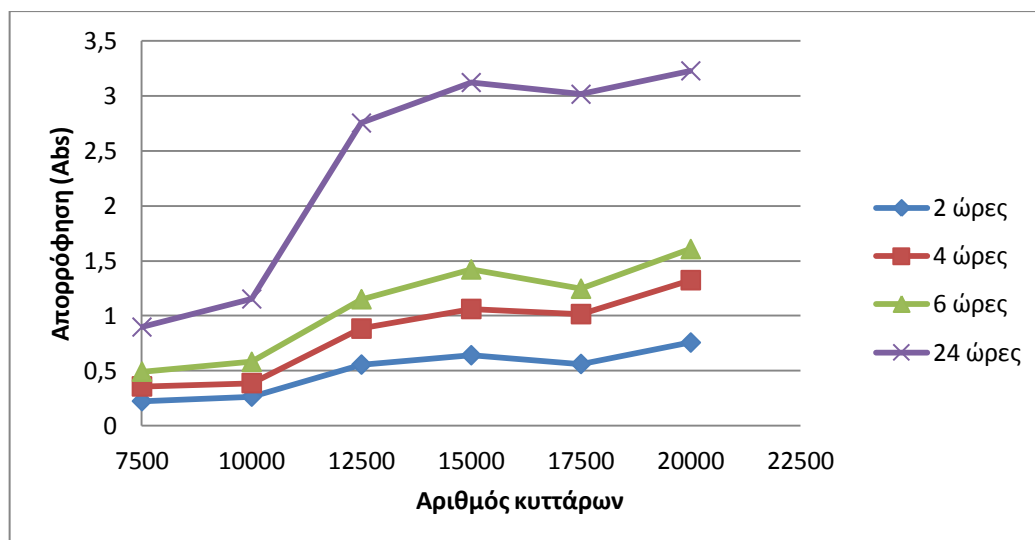
## **Γ. Αποτελέσματα - Συζήτηση**

### ***1. Τιτλοδότηση κυττάρων (titration)***

Η πρώτη πειραματική διαδικασία ονομάζεται τιτλοδότηση (titration) και αφορά στον προσδιορισμό του κατάλληλου αριθμού κυττάρων HeLa και MCF-7 που πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με διαφορετικές ώρες επώασης με το αντιδραστήριο XTT. Το πείραμα αυτό είναι σημαντικό γιατί επιτρέπει να εκτιμηθούν ακόμη και μικρές διαφορές στην αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, λόγω της επίδρασης του βετουλινικού οξέος.

#### ***A) Τιτλοδότηση κυττάρων HeLa (HeLa titration)***

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε φλάσκα επιφάνειας 25 m<sup>2</sup>, η οποία είχε υποστεί 20 περάσματα ανακαλλιέργειας (p<sub>20</sub>). Όταν τα κύτταρα κατέλαβαν κατά προσέγγιση το 80 % της επιφάνειας της φλάσκας, πραγματοποιήθηκε τρυψινοποίηση και μετρήθηκαν με χρήση της πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 7.500, 10.000, 12.500, 15.000, 17.500 και 20.000 κύτταρα, ανά πηγαδάκι αντίστοιχα, και χρησιμοποιήθηκαν 3 πηγαδάκια για τον κάθε αριθμό κυττάρων που εξετάστηκε (triplicates). Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγαδάκι σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM/ P/S απουσία ορού. Μετά από 24 ώρες, και αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στο πυθμένα των βοθρίων, προστέθηκε το αντιδραστήριο XTT. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm (με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm) μετά από 2, 4, 6 και 24 ώρες μετά από την προσθήκη του αντιδραστηρίου XTT. Στο πείραμα περιλαμβάνεται και δείγμα ελέγχου που περιέχει θρεπτικό υλικό και αντιδραστήριο XTT, αλλά δεν περιέχει κύτταρα. Τέλος, υπολογίστηκε η διαφορά της απορρόφησης του κάθε δείγματος από το δείγμα ελέγχου για το κάθε πηγαδάκι (**Γράφημα 1**).



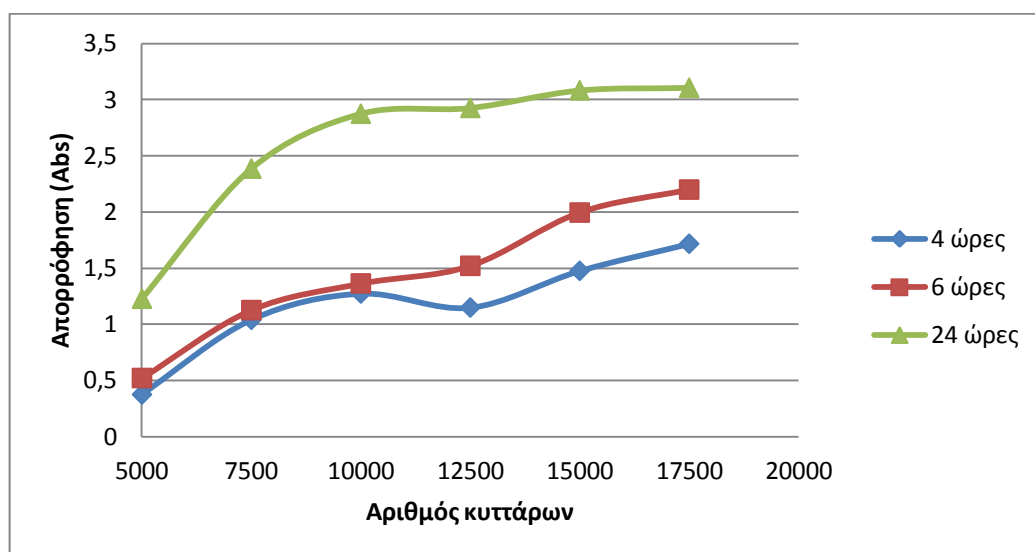
**Γράφημα 1:** Πείραμα τιτλοδότησης για τα κύτταρα HeLa

Στο γράφημα 1 η προσοχή επικεντρώνεται στο γραμμικό τμήμα που δημιουργούν οι καμπύλες για την κάθε διαφορετική χρονική περίοδο επώασης με το αντιδραστήριο XTT. Η επώαση των κυττάρων συνολικά με το αντιδραστήριο XTT για 2 ώρες δεν φαίνεται να συσχετίζεται γραμμικά με την απορρόφηση, και κατά συνέπεια δεν επιλέγεται αυτός ο χρόνος επώασης. Το ίδιο παρατηρείται όταν ο αριθμός των κυττάρων είναι μικρότερος από 10.000 και μεγαλύτερος από 15.000, για όλες τις ώρες επώασης με το αντιδραστήριο XTT (4, 6 και 24 ώρες). Από το γράφημα φαίνεται ότι γραμμική συσχέτιση αριθμού κυττάρων - απορρόφησης επιτυγχάνεται για 10.000 - 15.000 κύτταρα, σε συνδυασμό με 4, 6 και 24 ώρες επώασης με το XTT. Τελικά, επιλέγεται να χρησιμοποιηθούν 14.000 κύτταρα με χρόνο επώασης τις 6 ώρες.

### **B) Τιτλοδότηση κυττάρων MCF-7 (MCF-7 titration)**

Για το πείραμα τιτλοδότησης των κυττάρων MCF-7 μελετήθηκαν 5.000, 7.500, 10.000, 12.500, 15.000 και 17.500 κύτταρα (εις τριπλούν), τα οποία επώαστηκαν με το αντιδραστήριο XTT για 4, 6 και 24 ώρες. Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος επώασης των 2 ωρών με το XTT, γιατί δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα στο πείραμα τιτλοδότησης των κυττάρων HeLa (όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κομμάτι). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ελέγχου, δηλαδή δείγματα που περιέχουν θρεπτικό υλικό και αντιδραστήριο XTT, αλλά δεν περιέχουν κύτταρα. Μετά την

μέτρηση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm υπολογίστηκε η διαφορά της απορρόφησης του κάθε δείγματος από τα δείγματα ελέγχου (**Γράφημα 2**).



**Γράφημα 2:** Πείραμα τιτλοδότησης για τα κύτταρα MCF-7

Με στόχο την επιλογή του αριθμού των κυττάρων που συσχετίζεται γραμμικά με την απορρόφηση στους διαφορετικούς χρόνους επώασης με το αντιδραστήριο XTT, επιλέγεται τελικά να χρησιμοποιηθούν 14.000 κύτταρα σε συνδυασμό με 6 ώρες επώασης με το XTT.

## **2. Επίδραση του *betulinic acid* (BA) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές *HeLa* & *MCF-7***

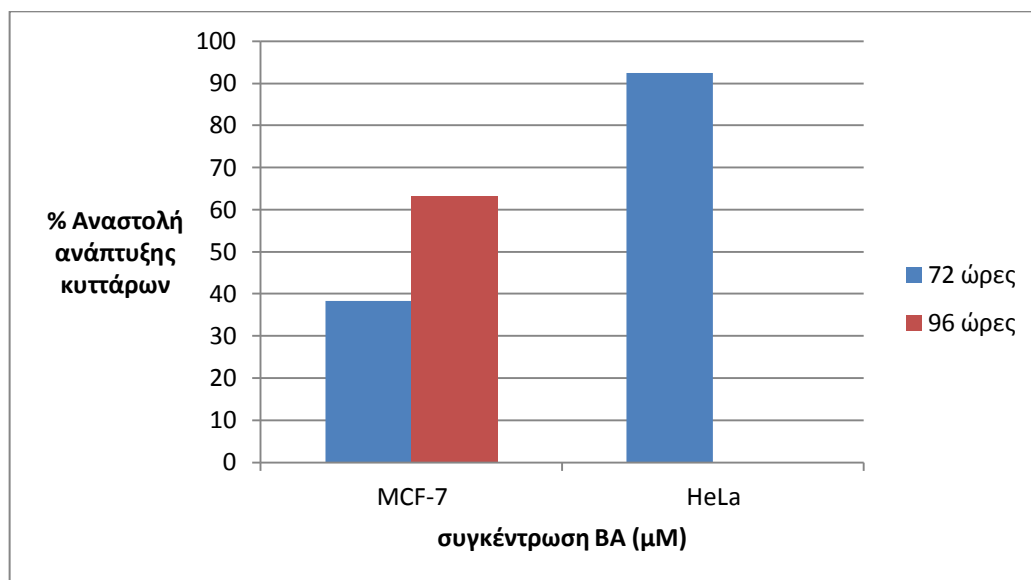
Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη των εξής παραγόντων:

- i) χρόνος που απαιτείται για να εμφανιστεί η δράση του BetA στην ανάπτυξη των κυττάρων.
- ii) επίδραση BetA διαφορετικής προέλευσης (εταιρείες Sigma Aldrich και Phytolab) στην κυτταρική ανάπτυξη.
- iii) επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων BetA στην ανάπτυξη κυττάρων, με απώτερο σκοπό τον υπολογισμό της τιμής IC<sub>50</sub> για την κάθε κυτταρική σειρά.

Οι παράμετροι αυτοί παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

i) Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε BetA που προμηθευτήκαμε από την εταιρία Sigma Aldrich με αριθμό καταλόγου 855057. Το BetA έχει μοριακό βάρος  $MB = 456,7 \text{ g/mol}$  και ο μοριακός τύπος του είναι  $C_{30}H_{48}O_3$ . Στο αρχικό στάδιο επιλέχθηκε τα κύτταρα να επωαστούν με μια υψηλή συγκέντρωση του BetA ( $200 \mu\text{M}$ ), με στόχο να εκτιμηθεί ο χρόνος που απαιτείται για να ασκήσει την δράση του, δηλαδή να επηρεάσει την κυτταρική ανάπτυξη. Η κάθε κυτταρική σειρά (HeLa και MCF-7) επώαστηκε 24, 48, 72 και 96 ώρες με BetA και ακολούθησε η προσθήκη του αντιδραστηρίου XTT για την εκτίμηση της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Παρατηρήθηκε ότι η επώαση των κυττάρων με BetA για 24 και 48 ώρες δεν επηρεάζει την ανάπτυξή τους. Η δράση του BetA είναι εμφανής μετά από 72 ώρες, ενώ μετά από 96 ώρες επώασης περιορίζεται σημαντικά η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa και MCF-7. Πρέπει να αναφερθεί ότι στο χρονικό αυτό διάστημα δεν παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης των δειγμάτων ελέγχου, δηλαδή κυττάρων χωρίς την επίδραση του BetA.

Στο **γράφημα 3** δίνονται τα ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa και MCF-7 μετά από επώαση με  $200 \mu\text{M}$  BetA για 72 και 96 ώρες.



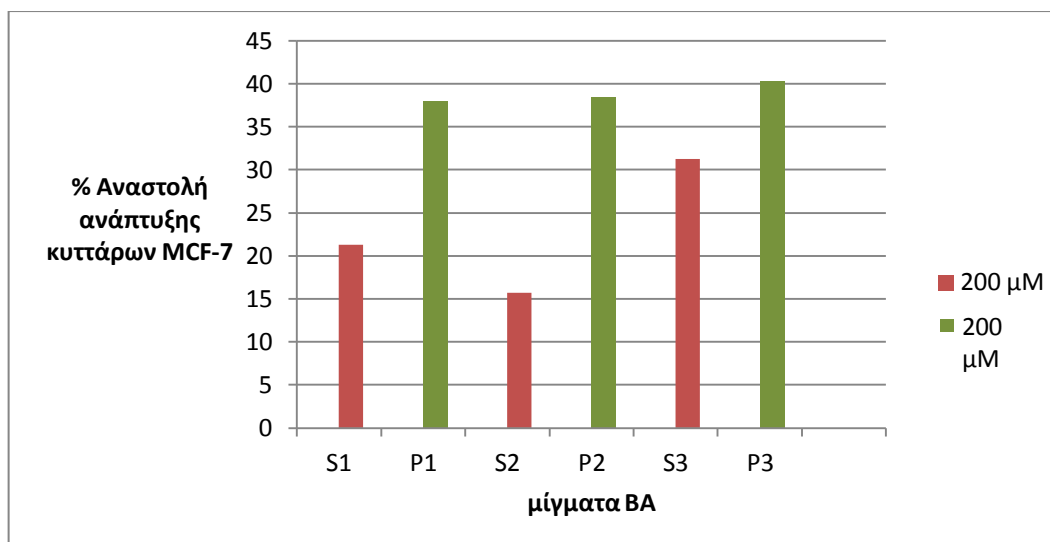
**Γράφημα 3:** Σύγκριση των ποσοστών αναστολής των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7 μετά από 72 και 96 ώρες επώασης τους σε  $200 \mu\text{M}$  BetA.

Στο γράφημα 3 φαίνεται ότι η αύξηση του χρόνου επώασης με το BetA, αυξάνει και το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7. Ειδικότερα, μετά από 72 ώρες επώασης με το BetA το ποσοστό αναστολής είναι 38% και φτάνει στο 62% μετά από επώαση 96 ωρών. Η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa αναστέλλεται σε ποσοστό 92% σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου μετά από επώαση 72 ωρών με 200  $\mu$ M BetA. Στα πειράματα που διεξάγονται στη συνέχεια τα κύτταρα HeLa επώαστηκαν με BetA για 72 ώρες, ενώ τα κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν με BetA για 96 ώρες.

ii) Ελέγχθηκαν διαλύματα βετουλινικού οξέος από δύο διαφορετικές εταιρείες, την Sigma – Aldrich και την Phytolab. Σκοπός αυτού του εγχειρήματος ήταν να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφορά στη αποτελεσματικότητα τους, όσον αφορά την αναστολή ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7, λόγω πιθανής διαφοράς στη σύσταση της ουσίας που παράγεται από τις δύο εταιρείες.

Το αντιδραστήριο BetA των εταιρειών Sigma και Phytolab διαλύθηκε αρχικά σε DMSO, για να παρασκευαστεί η συγκέντρωση των 25 mM και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αραιώσεις χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικής καθαρότητας DMSO, με κωδικό # D2650 και # D8418 από την εταιρία Sigma. Παρά το γεγονός ότι η τελική συγκέντρωση του BetA ήταν η ίδια (δηλαδή 25 mM), το εκχύλισμα BetA από την Sigma χρειαζόταν περισσότερο χρόνο για να διαλυθεί και ισχυρότερη ανάδευση. Τα stock των 25 mM BetA από την Sigma ή την Phytolab, παρασκευάστηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Ενδεικτικά, αυτά που προέρχονται από την Sigma συμβολίζονται με S1, S2, S3 και αυτά της Phytolab με P1, P2, P3. Έπειτα, εξετάστηκε η δραστηριότητά τους στην κυτταρική ανάπτυξη. Ειδικότερα, στα κύτταρα MCF-7 χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των 200  $\mu$ M και από τα έξι stock και το ποσοστό αναστολής που προκαλεί σε αυτά παρουσιάζεται στο ακόλουθο γράφημα (**Γράφημα 4**).

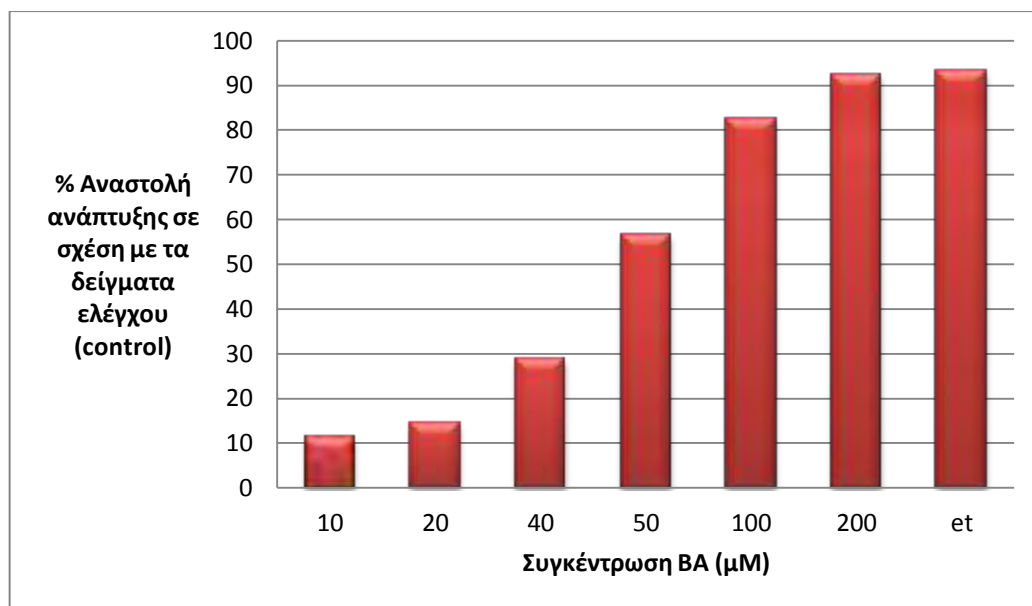




**Γράφημα 4:** Ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης που προκαλείται στα κύτταρα MCF-7, μετά από επώαση τους με διαφορετικά διαλύματα του BetA από Sigma και Phytolab σε συγκέντρωση 200μM

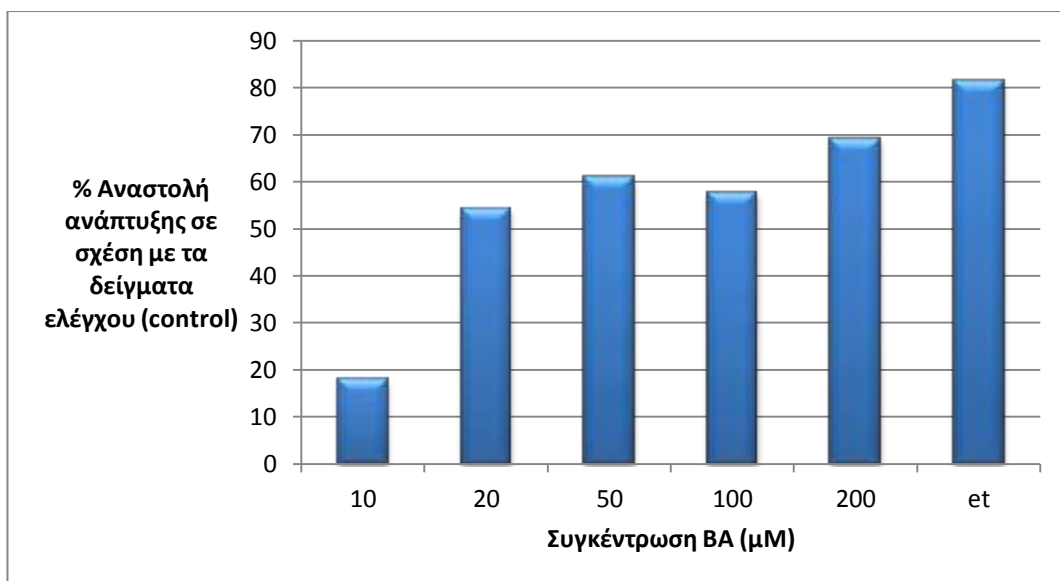
Στο παραπάνω διάγραμμα γίνεται σύγκριση μεταξύ των stock του BetA από τις δύο εταιρίες σε 3 διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1ο, 2ο, 3ο). Όπως είναι εμφανές και στις τρεις περιπτώσεις, το stock από την Phytolab είναι πιο δραστικό από αυτό της Sigma, δηλαδή προκαλεί αισθητά σημαντικότερο ποσοστό αναστολής στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7. Για το λόγο αυτό στα πειράματα που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BetA της εταιρείας Phytolab.

iii) Στη συνέχεια μελετήθηκε η αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa και MCF-7 από εύρος συγκεντρώσεων BetA μεταξύ 10 – 200 μM.



**Γράφημα 5:** *Αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HeLa μετά από επώαση με BetA αυξανόμενων συγκεντρώσεων και ετοποσίδη*

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του BetA που επωάζεται με τα κύτταρα HeLa, αυξάνεται και το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξής τους. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από τα 10 μM προκαλείται αναστολή 11,2%, η οποία για 20 μM γίνεται 14,4%, για 40 μM 28,7%, για 50 μM 56,6%, για 100 μM 82,2% και για 200 μM 92,4%. Το γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο ετοποσίδη, σε συγκέντρωση 1 μM, αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa σε ποσοστό 93,3% σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Συμπεραίνουμε ότι το BetA στη συγκέντρωση των 200 μM προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa σε ποσοστό ανάλογο της ετοποσίδης.



**Γράφημα 6:** Αναστολή ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση με BetA αυξανόμενων συγκεντρώσεων και ετοποσίδη

Για τα κύτταρα MCF-7 τα αποτελέσματα παρουσιάζονται διαφοροποιημένα όπως αναπαριστά το παραπάνω γράφημα. Ξεκινώντας από συγκέντρωση BetA 10  $\mu\text{M}$  η ανάπτυξη των κυττάρων αναστέλλεται κατά 17,8%. Στη συνέχεια, τα 20  $\mu\text{M}$  BetA προκαλούν αναστολή σε ποσοστό 54,2%, ενώ στα 50  $\mu\text{M}$  BetA η αναστολή είναι της τάξης του 60,7%. Η συγκέντρωση BetA των 100  $\mu\text{M}$  αναστέλλει την ανάπτυξη σε ποσοστό 57%, ενώ ισχυρότερη αναστολή παρατηρείται στα 200  $\mu\text{M}$ , σε ποσοστό 69,2%.

Προκειμένου να καθοριστεί η συγκέντρωση του βετουλινικού οξέος η οποία χρειάζεται ώστε να επιτευχθεί αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%, δηλαδή η τιμή  $\text{IC}_{50}$ , καθίσταται απαραίτητο να υπολογιστεί πρώτα η μέση τιμή 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων. Λόγω όμως του γεγονότος ότι τα αποτελέσματα που συνέβαλλαν στην δημιουργία των παραπάνω γραφημάτων και για τις δύο κυτταρικές σειρές δεν απορρέουν, από τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες, δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια η τιμή  $\text{IC}_{50}$  και για το λόγο αυτό εκτιμάται κατά προσέγγιση με βάση τις δεδομένες τιμές. Συγκεκριμένα, η τιμή  $\text{IC}_{50}$  για τα κύτταρα HeLa εκτιμάται μεταξύ 40 – 50  $\mu\text{M}$  και για τα κύτταρα MCF-7 εκτιμάται μεταξύ των τιμών 10 – 20  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα.

## **Δ. Συμπεράσματα**

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το βετουλινικό οξύ (BetA) είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο το οποίο κυρίως απομονώνεται από το φλοιό της Λευκής Σημύδας (*Betula alba*). Έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντιβακτηριδιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιπαρασιτική και αντικαρκινική δράση. Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στον περαιτέρω *in vitro* χαρακτηρισμό της αντικαρκινικής δράσης του βετουλινικού οξέος. Επιλέχθηκαν δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές οι οποίες ήταν τα κύτταρα μαστικού (MCF-7) και τραχηλικού αδενοκαρκινώματος (HeLa). Αυτές οι κυτταρικές σειρές αρχικά επώαστηκαν με υψηλή συγκέντρωση (200  $\mu$ M) από δύο διαφορετικά διαλύματα BetA των εταιρειών Sigma – Aldrich και Phytolab. Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα της εταιρείας Phytolab είχε αυξημένη διαλυτότητα στο DMSO σε σχέση με της εταιρείας Sigma. Αυτή η διαφορά διαλυτότητας επεξηγεί ενδεχομένως και την αισθητά πιο ισχυρή δράση του εκχυλίσματος της Phytolab έναντι της Sigma. Η σημαντική αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 που προκαλούσε το BetA της Phytolab, το κατέστησε ως το κατάλληλο για την διεξαγωγή των περαιτέρω πειραμάτων.

Αξιοσημείωτη είναι και η διαφορά στο χρόνο επώασης των κυτταρικών σειρών με το BetA. Τα HeLa χρειάστηκαν 72 ώρες επώασης με το BetA για να υποστούν μέγιστη αναστολή της ανάπτυξής τους, σε αντίθεση με τα MCF-7, που απαιτούσαν 96 ώρες. Το BetA προκάλεσε αξιόλογη αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού και των δύο κυτταρικών σειρών, σε διαφορετικό όμως βαθμό. Συγκεκριμένα σε 200  $\mu$ M συγκέντρωσης BetA σημειώθηκε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HeLa, σε ποσοστό 92,4%, αρκετά υψηλότερο από το 69,2% που προκλήθηκε στα MCF-7. Τέλος, έγινε προσπάθεια υπολογισμού της τιμής  $IC_{50}$  για την κάθε κυτταρική σειρά, οι οποίες εκτιμήθηκαν κατά προσέγγιση ότι κυμαίνονται μεταξύ των 40 – 50  $\mu$ M για τα κύτταρα HeLa και των 10 -20  $\mu$ M για τα κύτταρα MCF -7.

Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, πιθανότατα αιτιολογούνται από το βιοχημικό μονοπάτι, μέσω του οποίου το BetA ασκεί την κυτταροτοξική του δράση. Είναι δυνατόν να εμπλέκονται διαφορετικά κυτταρικά μόρια που να πυροδοτούν την έναρξη διαφορετικών αντίστοιχα οδών μεταγωγής των σημάτων ή ίσως υπάρχουν μόρια επαγωγείς ή

αναστολείς που δρουν σε κάθε κυτταρική σειρά και ενισχύουν ή εμποδίζουν την μετάδοση των εναρκτήριων ερεθισμάτων.

Με την παρούσα μελέτη συνεπώς, αναδείχτηκε ότι το βετουλινικό οξύ παρουσιάζει αντικαρκινική δράση, η οποία εξαρτάται από το είδος της κυτταρικής σειράς που εφαρμόζεται και από την συγκέντρωσή του. Επόμενος στόχος ήταν να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο ασκείται αυτή η δράση. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά, το βετουλινικό οξύ έχει πολυάριθμους στόχους.

Η αρχική υπόθεση βασίστηκε στο ότι το BetA πιθανώς ασκεί τη δράση του μέσω του PPAR-γ. Ο PPAR-γ ονομάζεται ενεργοποιημένος υποδοχέας πολλαπλασιασμού στα υπεροξειδιοσώματα. Συνιστά μια πρωτεΐνη η οποία είναι μέλος της υπεροικογένειας πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, εμφανίζεται σε 4 διαφορετικές ισομορφές και είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος από τον προσδέτη. Μπορεί να εκφράζεται σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων μέσα στα οποία ανήκουν και τα κύτταρα HeLa και MCF-7 που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας εργασίας. Ο PPAR-γ ελέγχει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, κωδικοποιώντας πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης, στη φλεγμονή, την παχυσαρκία και στο καρκίνο. Συγκεκριμένα, μπορεί να ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κακοήθων κυττάρων. Μελλοντικός στόχος είναι η μελέτη της συγχορήγησης BetA με φυσικούς ή συνθετικούς ανταγωνιστές του PPAR-γ, ώστε να διερευνηθεί αν η δράση του BetA επιτελείται μέσω του παραπάνω υποδοχέα.

## **ΣΤ. Βιβλιογραφία**

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ames BN, Gold LS, Willett WC: The causes and prevention of cancer, 1995, Proc Nat Acad Sci USA, 92: 5258-5265
- Apoptosis as a Novel Target for Cancer Chemoprevention, Shi-Yong Sun, Numsen Hail, Jr., Reuben Lotan
- Betulinic acid: A natural product with anticancer activity, Simone Fulda, University Children's Hospital, Ulm, Germany
- Asian Studies on Cancer Chemoprevention, Laboratory of Experimental Pathology, Korea Cancer Center Hospital, 215-4 Gongneung Dong, Nowon Ku, Seoul, Korea
- Chemoprevention of cancer, Michael B. Sporn and Nanjoo Suh, Department of Pharmacology, Dartmouth Medical School, Hanover, NH03755, USA
- Betulinic Acid Selectively Increases Protein Degradation and Enhances Prostate Cancer-Specific - Apoptosis: Possible Role for Inhibition of Deubiquitinase Activity Teresita Reiner, Ricardo Parrondo, [...], and Carlos Perez-Stable
- Betulinic Acid Inhibits Growth of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro by Inducing G Arrest and Apoptosis, Raja Kumar Vadivelu, Swee Keong Yeap, [...], and Noorjahan Banu Alitheen
- Therapeutic exploration of betulinic acid in chemically induced hypothyroidism, Muhammad Afzal, Fahad A. Al-Abbasi, Imran Kazmi, Firoz Anwar, Susmita Semwal, Mol Cell Biochem DOI 10.1007/s11010-013-1842-0
- Design, synthesis and biological evaluation of novel betulinic acid derivatives, Shengjie Yang, Na Liang, [...], and Song Yang
- Manolis Pasparakis, Role of NF-kB in epithelial biology, Institute for Genetics, University of Cologne
- Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells, Wojciech Rzeski & Andrzej Stepulak & Marek Szymanski & Marco Sifringer & Jozef Kaczor & Katarzyna Wejksza & Barbara Zdzisinska & Martyna Kandefer-Szerszen, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2006) 374:11–20 DOI 10.1007/s00210-006-00901
- Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention, Simone Fulda, University Children's Hospital, Eythstr. 24, 89075 Ulm, Germany Int. J. Mol. Sci. 2008, 9, 1096-1107; DOI: 10.3390/ijms9061096
- 2-Cyano-lup-1-en-3-oxo-20-oic acid, a cyano derivative of betulinic acid, activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in colon and pancreatic cancer cells, Carcinogenesis vol.28 no.11 pp.2337–2346, 2007



- Lamin B1 Is a Novel Therapeutic Target of Betulinic Acid in Pancreatic Cancer, Lei Li, Yiqi Du, Xiangyu Kon, Zhaoshen Li, Zhiliang Jia, Jun Gao, Guokun Wang and Keping Xie, Clin Cancer Res September 1, 2013 19; 4651
- Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome dependent and -independent down regulation of specificity proteins (Sp) transcription factors, Sudhakar Chintharlapalli, Sabitha Papineni, Ping Lei, Satya Pathi and Stephen Safe
- Cancer Chemoprevention: A Summary of the Current Evidence, STEFANOS BONOVAS, ARGIRIOS TSANTES, THEOFANIS DROSOS and NIKOLAOS M. SITARAS, Department of Pharmacology and Attikon General Hospital, School of Medicine, University of Athens; Pammakaristos General Hospital, Athens, Greece
- Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties Perumal Yogeeswari and Dharmarajan Sriram, Pharmacy Department, Birla Institute of Technology & Science, Pilani-333031, INDIA
- Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity Rita C. Santos, Jorge A. R. Salvador, Silvia Marin, Marta Cascante, Bioorganic & Medicinal Chemistry 17 (2009) 6241–6250
- Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer Anupam Bishayee, Shamima Ahmed, Nikoleta Brankov and Marjorie Perloff, Cancer Therapeutics and Chemoprevention Group, Department of Pharmaceutical Sciences, Northeastern Ohio Universities Colleges of Medicine and Pharmacy, 4209 State Route 44, Rootstown, OH 44272, USA, Front Biosci. ; 16: 980–996.
- Antagonism of Betulinic Acid on LPS-Mediated Inhibition of ABCA1 and Cholesterol Efflux through Inhibiting Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling Pathway and miR-33 Expression, Guo-Jun Zhao, Shi-Lin Tang, [...], and Chao-Ke Tang
- New ionic derivatives of betulinic acid as highly potent anticancer agents Suresh Chall, Hua Zhao Angelique Gumbs, Chellu S. Chetty and Himangshu S. Bose, Bioorg Med Chem Lett. 2012 February 15; 22(4): 1734–1738. doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.102.
- Functional implications of genetic variation in human PPAR $\gamma$  Ellen H. Jeninga, Mark Gurnell and Eric Kalkhoven, Department of Metabolic and Endocrine Diseases, UMC Utrecht, Lundlaan 6, 3584 EA Utrecht, The Netherlands
- PPAR- $\gamma$  Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer, Belfiore, M. Genua and R. Malaguarnera, Endocrinology Unit, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Catanzaro, 88100 Catanzaro, Italy

- Ames BN, Gold LS: Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens, 1990, Proc Nat Acad Sci USA, 87: 7772-7776
- Fika V: Endometriosis of the cervix uteri incidence and histogenesis, 1986, Annual of Medical School, Aristotelium University of Thessaloniki, 16: 183-184
- Liu, Y., Wang, H., Ye, H. C., and Li, G. F. (2005) Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering, J Integr Plant Biol 47, 769-782
- Connolly J.D. and Hill R.A. 1991. Dictionary of Terpenoids. 1<sup>st</sup> Edn., Chapman and Hall, London, New York, ISBN: 041225770X, pp:80-182
- Χατζόπουλος Π. Βιοτεχνολογία φυτών, εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ 2004 101
- Kanno Y : Modulation of cell communication and carcinogenesis, 1985, Jpn J Physiol, 35: 693-707
- Nicolson GL : Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype from oncogene to oncofetal expression, 1987, Cancer Res, 47: 1473-1487
- Fialkow PJ : Clonal origin of human tumors, 1979, Annu Rev Med, 30: 135-143
- Trosko JE and Chang CC: Stem cell theory of carcinogenesis, 1989, Toxicol Lett, 49: 283-295
- Harris H: The genetic analysis of malignancy, 1986, J Cell Sci, 4: 431-444
- Morgan DO: Principles of CDK regulation, 1995, Nature, 374: 131-134
- Sherr CJ: Cancer cell cycles, 1996, Science, 274: 1672-1677
- Kim NW et al: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, 1994, Science, 266: 2011-2015
- Kiyoto T, Foster S, Koop S et al: Both Rb/p16 INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells, 1998, Nature, 396: 84-88
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene, 1991, Nature, 351: 453-455
- Morse MA, Stoner GC: Cancer chemoprevention: principles and prospects. (1993) Carcinogenesis, 14:1737-1746
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Crowell JA, Lubet R, Sigman CC: Progress in cancer chemoprevention: perspectives on agent selection and short term clinical intervention trials (1994) Cancer Res, 54: 2015-2024
- Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS: Chemoprevention (1995) CA Cancer J Clin, 45: 31-49
- ACS. Cancer Facts and Figures, 1995. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1-3
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) Cancer Res, 45: 1-8

- De Flora S, Ramel C: Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis (1990) Basic Life Sci, 52: 461-462
- Hill DL, Grubbs CJ: Retinoids and cancer prevention (1992) Annu Rev Nutr, 12: 161-181
- Oren M: The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis (1992) Cancer Metastasis Rev, 11: 141-148
- Σημειώσεις Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Δημήτριος Κουρέτας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. Nat Med 1995; 1: 1046-1051
- Chen QH, Fu ML, Liu J, Zhang HF, He GQ, Ruan H. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology. Ultrason Sonochem 2008;
- Eiznhamer DA, Xu ZQ. Betulinic acid: a promising anticancer candidate. IDrugs 2004; 7: 359-373
- Miles DH, Kokpol U, Zalkow LH, Steindel SJ, Nabors JB. Tumor inhibitors. I. Preliminary investigation of antitumor activity of Sarracenia flava. J Pharm Sci 1974; 63: 613-615
- Kingston DG, Munjal RC. Plant anticancer agents. VIII. Constituents of Inga punctata. Lloydia 1978; 41: 499-500
- Trumbull ER, Bianchi E, Eckert DJ, Wiedhopf RM, Cole JR. Tumor inhibitory agents from Vauquelinia corymbosa (Rosaceae). J Pharm Sci 1976; 65: 1407-1408
- Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. Med Res Rev 2004; 24: 90-114
- Yogeewari P, Sriram D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. Curr Med Chem 2005; 12: 657-666
- Alakurtti S, Makela T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. Eur J Pharm Sci 2006; 29: 1-13
- Rzymowska J. The effect of aqueous extracts from Inonotus obliquus on the mitotic index and enzyme activities. Boll Chim Farm 1998; 137: 13-15
- Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB et al. AntiAIDS

- Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod* 1994; 57: 243-247
- Mayaux JF, Bousseau A, Pauwels R, Huet T, Henin Y, Dereu N et al. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3564-3568
- Li F, Goila-Gaur R, Salzwedel K, Kilgore NR, Reddick M, Matallana C et al. PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13555-1356
- Smith PF, Ogundele A, Forrest A, Wilton J, Salzwedel K, Doto J et al. Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of singledose
- Adamson CS, Waki K, Ablan SD, Salzwedel K, Freed EO. Impact of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors on evolution of resistance to the maturation inhibitor bevirimat (PA-457). *J Virol* 2009; 83: 4884-4894
- Zhou J, Chen CH, Aiken C. Human immunodeficiency virus type 1 resistance to the small molecule maturation inhibitor 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-betulinic acid is conferred by a variety of single amino acid substitutions at the CA-SP1 cleavage site in Gag. *J Virol* 2006; 80: 12095-12101
- Dang Z, Lai W, Qian K, Ho P, Lee KH, Chen CH et al. Betulinic Acid Derivatives as Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Inhibitors (parallel). *J Med Chem* 2009
- Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol* 2008; 120: 272-276.
- Steele JC, Warhurst DC, Kirby GC, Simmonds MS. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother Res* 1999; 13: 115-119
- de Sa MS, Costa JF, Krettli AU, Zalis MG, Maia GL, Sette IM et al. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives in vitro against *Plasmodium falciparum* and in vivo in *P. berghei*-infected mice. *Parasitol Res* 2009; 105: 275-279
- Gautam R, Jachak SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev* 2009
- Enwerem NM, Okogun JI, Wambebe CO, Okorie DA, Akah PA. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlinia grandiflora* and one of its active principles, Betulinic acid. *Phytomedicine* 2001; 8: 112-114

- Udeani GO, Zhao GM, Geun SY, Cooke BP, Graham J, Beecher CW et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos* 1999; 20: 379-383
- Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M et al. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 4956-4964
- Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling-Indeck L, Pezzuto JM. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2007-2010
- Lee WS, Im KR, Park YD, Sung ND, Jeong TS. Human ACAT-1 and ACAT-2 inhibitory activities of pentacyclic triterpenes from the leaves of *Lycopus lucidus* TURCZ. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 382-384.
- Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13018-13023.
- Chung MY, Rho MC, Lee SW, Park HR, Kim K, Lee IA et al. Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by betulinic acid from *Alnus hirsuta*. *Planta Med* 2006; 72: 267269.
- de Melo CL, Queiroz MG, Arruda Filho AC, Rodrigues AM, de Sousa DF, Almeida JG et al. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 87768781.
- Willmann M, Wacheck V, Buckley J, Nagy K, Thalhammer J, Paschke R et al. Characterization of NVX-207, a novel betulinic acid-derived anti-cancer compound. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 384-394.
- Tan Y, Yu R, Pezzuto JM. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2866-2875.
- Rieber M, Rieber MS. Signalling responses linked to betulinic acid-induced apoptosis are antagonized by MEK inhibitor U0126 in adherent or 3D spheroid melanoma irrespective of p53 status. *Int J Cancer* 2006; 118: 1135-1143.
- Qiu L, Wang Q, Di W, Jiang Q, Schefeller E, Derby S et al. Transient activation of EGFR/AKT cell survival pathway and expression of survivin contribute to reduced sensitivity of human melanoma cells to betulinic acid. *Int J Oncol* 2005; 27: 823-830.
- Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res* 2007; 67: 2816-2823.

- Ferraro C, Quemeneur L, Fournel S, Prigent AF, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. The topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide induce a CD95-independent apoptosis of activated peripheral lymphocytes. *Cell Death Differ* 2000; 7: 197206.
- Wada S, Tanaka R. Betulinic acid and its derivatives, potent DNA topoisomerase II inhibitors, from the bark of *Bischofia javanica*. *Chem Biodivers* 2005; 2: 689-694.
- Chowdhury AR, Mandal S, Mittra B, Sharma S, Mukhopadhyay S, Majumder HK. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit* 2002; 8: BR254-BR265.
- Ganguly A, Das B, Roy A, Sen N, Dasgupta SB, Mukhopadhyay S et al. Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer Res* 2007; 67: 1184811858.
- Bar FM, Khanfar MA, Elnagar AY, Liu H, Zaghloul AM, Badria FA et al. Rational Design and Semisynthesis of Betulinic Acid Analogues as Potent Topoisomerase Inhibitors. *J Nat Prod* 2009;
- Takada Y, Aggarwal BB. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. *J Immunol* 2003; 171: 3278
- Sawada N, Kataoka K, Kondo K, Arimochi H, Fujino H, Takahashi Y et al. Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Br J Cancer* 2004; 90: 1672-1678.
- Huang L, Ho P, Chen CH. Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS Lett* 2007; 581: 4955-4959.
- Tsukamoto S, Yokosawa H. Targeting the proteasome pathway. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 605-621. 3286.
- Rabi T, Shukla S, Gupta S. Betulinic acid suppresses constitutive and TNFalpha-induced NF-kappaB activation and induces apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Mol Carcinog* 2008; 47: 964-973.
- Kasperczyk H, La Ferla-Bruhl K, Westhoff MA, Behrend L, Zwacka RM, Debatin KM et al. Betulinic acid as new activator of NF-kappaB: molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* 2005; 24: 6945-6956.

- Chen Z, Wu Q, Chen Y, He J. Effects of betulinic acid on proliferation and apoptosis in Jurkat cells and its in vitro mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technology*
- Rajendran P, Jaggi M, Singh MK, Mukherjee R, Burman AC. Pharmacological evaluation of C-3 modified Betulinic acid derivatives with potent anticancer activity. *Invest New Drugs* 2008; 26: 25-34.
- Wachsberger PR, Burd R, Wahl ML, Leeper DB. Betulinic acid sensitization of low pH adapted human melanoma cells to hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2002; 18: 153-164.
- Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic Acid. *Neoplasia* 2005; 7: 162-170.
- Eder-Czembirek C, Czembirek C, Erovic BM, Selzer E, Turhani D, Vormittag L et al. Combination of betulinic acid with cisplatin--different cytotoxic effects in two head and neck cancer cell lines. *Oncol Rep* 2005; 14: 667-671.
- Jung GR, Kim KJ, Choi CH, Lee TB, Han SI, Han HK et al. Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101: 277-285.
- Yamai H, Sawada N, Yoshida T, Seike J, Takizawa H, Kenzaki K et al. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *Int J Cancer* 2009; 125: 952-960.
- Kim DS, Pezzuto JM, Pisha E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8: 1707-1712.
- Kvasnica M, Sarek J, Klinotova E, Dzubak P, Hajdich M. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 3447-3454.

### Ιστοσελίδες

- <http://www.n3dbio.com>,
- <http://cellbiology.med.unsw.edu.au>
- <http://www.emsdiasum.com>
- <http://asepticsupplies.co.uk>
- <http://www.gdbiotec.com>
- <http://gardenofpraise.com>
- <http://www.botanical.com>

- <http://www.emsdiasum.com>
- <http://www.cf.ac.uk>
- <https://www.applichem.com>
- <https://www.evergreensci.com>
- <http://www.bio-connect.nl/c>
- <http://science.howstuffworks.com>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.homeremedycentral.com>
- <http://www.cancer.org>
- <http://legacy.uspharmacist.com>
- <http://usa.weleda.com>
- <http://en.wikipedia.org>
- <http://www.springerimages.com>
- <http://users.physics.harvard.edu>
- <http://www.nature.com>
- <http://www.fccc.edu>
- <http://www.hakeem sy.com>